RAÍSSA ALVARENGA CARVALHO GOMIDE

DESENVOLVIMENTO DE BIOPOLÍMEROS ATIVOS DE ISOLADO PROTEICO DE SORO DE LEITE E MICROPARTÍCULA DE LIGNINA PARA APLICAÇÃO EM ALIMENTOS

LAVRAS – MG
2020

RAÍSSA ALVARENGA CARVALHO GOMIDE

DESENVOLVIMENTO DE BOPOLÍMEROS ATIVOS DE ISOLADO PROTEICO DE SORO DE LEITE E MICROPARTÍCULA DE LIGNINA PARA APLICAÇÃO EM ALIMENTOS

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

Profa. Dra. Soraia Vilela Borges
Orientadora
Prof. Dr. Cassiano Rodrigues de Oliveira
Coorientador

LAVRAS – MG
2020

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

Gomide, Raíssa Alvarenga Carvalho.
Desenvolvimento de biopolímeros ativos de isolado proteico de soro de leite e micropartícula de lignina para aplicação em alimentos / Raíssa Alvarenga Carvalho Gomide. - 2020.
114 p. : il.

Orientador(a): Soraia Vilela Borges.
Coorientador(a): Cassiano Rodrigues de Oliveira.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2020.
Bibliografia.

1. Biopolímeros ativos. 2. Micropartícula de lignina. 3. Isolado proteico de soro de leite. I. Borges, Soraia Vilela. II. de Oliveira, Cassiano Rodrigues. III. Título.

RAÍSSA ALVARENGA CARVALHO GOMIDE

DESENVOLVIMENTO DE BIOPOLÍMEROS ATIVOS DE ISOLADO PROTEICO DE SORO DE LEITE E MICROPARTÍCULA DE LIGNINA PARA APLICAÇÃO EM ALIMENTOS

DEVELOPMENT OF WHEY PROTEIN ISOLATE / LIGNIN MICROPARTICLES ACTIVE BIOPOLYMERS FOR FOOD APPLICATION

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

APROVADA em 20 de março de 2020.

Dr. Cassiano Rodrigues de Oliveira - UFV

Dra. Marali Vilela Dias - UFLA

Dr. Eduardo Mendes Ramos - UFLA

Dra. Viviane Machado Azevedo - UFLA

Profa. Dra. Soraia Vilela Borges
Orientadora

LAVRAS – MG
2020

À minha família, em especial Nádia e Richardson, João Paulo e Lavínia, pelo apoio e incentivo.
Sem vocês eu nada seria. Amo-os.

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me conceder uma vida de saúde, sabedoria e curiosidade que foram tão necessários para a conclusão desta etapa.

Aos meus orientadores Soraia Vilela Borges e Cassiano Rodrigues de Oliveira pela confiança, incentivo e conhecimentos compartilhados. Em especial à Soraia, por esses seis anos de orientação e amizade, obrigada pela oportunidade e por me ensinar tanto!

À Univerisade Federal de Lavras e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos da UFLA, pela oportunidade concedida para minha formação durante os anos de mestrado e doutorado.

Ao Departamento de Ciência dos Alimentos da UFLA, em especial ao Laboratório de Embalagens, pelo espaço e infraestrutura para a realização do projeto.

Aos meus pais, Nádia e Richardson, irmãs Laís, Rízia e Luma e minha querida sobrinha Helena, por sempre estarem ao meu lado com seu amor e amizade incondicionais, me apoiando e incentivando a cada escolha.

Ao meu marido João Paulo e minha filha Lavínia, por serem minha fonte diária de amor, energia e paz. Me sinto abençoada e imensamente grata à Deus por me permitir viver essa vida ao lado de vocês, minha família.

Às minhas avós, tios e primas, que sempre torceram por mim.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Embalagens da UFLA, Ana Carolina, Lucas, Viviane, Taline, Bruna, Ana Cristina, Eloá, Mariah, Jayne e Danielly, que tanto me auxiliaram nessa caminhada.

Às amigas e colegas do Departamento de Nutrição da UFLA: Vânia, Adriana, Gláucia, Letícia, Marcella, Carol, Melissa, Andrezza, Camila, Sabrina, e demais colegas pelo carinho e incentivo e a meu chefe Wilson pela compreensão e incentivo para que essa etapa fosse concluída.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural (LME) e à Central de Analise e Prospecção Química (CAPQ) pela infratestrutura, ambos localizados na UFLA, e as técnicas administrativas Aline, Elisa, Lidiany e Franciane pela paciência e competência na realização de muitas análises.

Ao Laboratório de Físico-Química e Caracterização de Alimentos, localizado na UFLA, e ao técnico administrativo Geraldo pelo auxílio na realização de análises.

Aos colaboradores Odílio Benedito Garrido de Assis da EMBRAPA Instrumentação e Maria Irene Yoshida da Universidade Federal de Minas Gerais pela ajuda em análises.

Ao Laboratório de Carnes da UFLA, pelo apoio técnico e científico durante à execução de parte deste projeto, em especial ao professor Eduardo e a pós-graduanda Lorena, pela paciência, confiança, atenção e ensinamentos. Também a todos os integrantes do Laboratório de Carnes por me receberem com carinho.

Aos professores que tive durante toda minha formação escolar e acadêmica, por todo conhecimento a mim transmitido.

Aos membros da banca examinadora: Cassiano Rodrigues de Oliveira, Marali Vilela Dias, Eduardo Mendes Ramos e Viviane Machado Azevedo.

A todos, meu sincero agradecimento!

"*Não existe grandeza onde não há simplicidade, bondade e verdade*"

(Leon Tolstoi)

RESUMO GERAL

Neste trabalho foi desenvolvido um biopolímero ativo de isolado proteico de soro de leite (IPS) e micropartícula de lignina (MPL). O IPS foi utilizado como base polimérica tendo glicerol como plastificante e MPL como material de reforço e antioxidante. Na primeira etapa do estudo a MPL foi produzida e caracterizada pelas análises de difração de raios-X (DRX), potencial zeta, infravermelho (FTIR), tamanho de partícula, microscopia eletrônica de varredura (MEV), análise termogravimétrica (TGA), teor de compostos fenólicos e potencial antioxidante. Na segunda etapa, a MPL foi adicionada em diferentes concentrações a filmes de IPS produzidos por *casting* e os biopolímeros foram caracterizados quanto às propriedades estruturais (DRX e FTIR), morfológicas (MEV), físicas (TGA e calorimetria diferencial de varredura - DSC, mecânica, barreira ao vapor de água e cor) e antioxidante. Na última etapa foram realizadas análises antioxidante dos biopolímeros ativos e a aplicação dos filmes em carne moída (*Biceps femoris)* com objetivo de se avaliar a capacidade de prevenção da oxidação lipídica das carnes pelos filmes ativos, através das análises de identificação de compostos voláteis por cromatografia gasosa (CG-MS), índice de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e cor (*L**, *a**, *b**, *C**, *h**), durante o armazenamento a 4ºC ± 1°C por 4 dias. Os resultados da primeira etapa demonstraram que não houve modificação na natureza química da lignina após diminuição de seu tamanho em MPL. Além disso, a diminuição do tamanho da partícula reduziu o potencial zeta da suspensão de lignina, aumentando a dispersão e a estabilidade térmica, houve exposição de maior número de compostos fenólicos com aumento da concentração de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante, confirmando o potencial de utilização da MPL em biopolímeros ativos. A segunda etapa demonstrou que a adição da MPL também preservou as ligações químicas presentes nos filmes, porém houve redução da cristalinidade dos filmes, característica da molécula de MPL. Concentrações intermediárias de MPL (a 0,25 e 0,50% p/p) promoveram boa dispersão das MPL pela superfície e interior dos filmes. Tal dispersão permitiu melhor resistência térmica (aumento da Tg e temperatura de início da degradação), aumento das propriedades mecânicas e de barreira ao vapor de água. A adição de MPL também permitiu a formação de filmes mais escuros, avermelhados e transparentes e com manutenção da atividade antioxidante observada para a MPL. A terceira etapa demonstra que há uma tendência de aumento da atividade antioxidante dos filmes com o aumento da concentração de MPL. Houve diminuição no índice de TBARS com o tempo de armazenamento. Além disso, a identificação de 30 compostos fenólicos nas amostras de carne sendo 7 deles presentes em todos os tempos e amostragem: pentadecano, octadecano, hexanal, heptanal, octanal, nonanal de decanal, com diminuição das áreas dos picos relativos - hexanal, heptanal, octanal e decanal das amostras acondicionadas nos filmes ativos. A cor das carnes apresentou comportamento esperado variando de vermelho brilhante à marrom durante o armazenamento, sem diferença entre os tratamentos. Pelo trabalho, sugere-se que a adição de 0,50% (p/p) de MPL seja a concentração ideal para sua atuação como material de reforço e antioxidante em filmes de IPS produzidos por *casting*.

Palavras-chave: Lignina. IPS. Embalagem de alimentos. Caracterização. Filme ativo.

GENERAL ABSTRACT

In this work, an active biopolymer of whey protein isolate (WPI) and lignin microparticle (LMP) was developed. WPI was used as a polymeric base with glycerol as plasticizer and LMP as reinforcement and antioxidant material. In the first stage of the study, LMP was produced and characterized by the analysis of X-ray diffraction (XRD), zeta potential, infrared (FTIR), particle size, scanning electron microscopy (SEM), thermogravimetric analysis (TGA), content phenolic compounds and antioxidant potential. In the second stage, LMP was added in different concentrations to WPI films produced by *casting* and the biopolymers were characterized in terms of structural (XRD and FTIR), morphological (SEM), physical (TGA and differential scanning calorimetry - DSC, mechanical properties, water vapor barrier and color) and antioxidant activity. In the last stage, antioxidant analyzes of the active biopolymers and the application of the films in ground meat (*Biceps femoris*) were carried out in order to evaluate the ability to prevent lipid oxidation of meat by active films, through the analysis of identification of volatile compounds by gas chromatography (GC-MS), thiobarbituric acid reactive species index (TBARS) and color (L^*, a^*, b^*, C^*, h), during storage at 4ºC ± 1°C for 4 days. The results of first stage showed that there was no change in the chemical nature of lignin after its size was reduced in LMP. In addition, the decrease in particle size reduced the zeta potential of the lignin suspension, increasing dispersion and thermal stability, there was exposure of a greater number of phenolic compounds with increased concentration of total phenolic compounds and antioxidant activity, confirming the potential for use of LMP in active biopolymers. The second stage demonstrated that the addition of LMP also preserved the chemical bonds present in the films, however there was a reduction in the crystallinity index of films, characteristic of the LMP. Intermediate concentrations of LMP (at 0.25 and 0.50% w/w) promoted good dispersion of LMP over the surface and interior of the films. Such dispersion allowed better thermal resistance (increase in Tg and temperature of onset degradation), increase in mechanical properties and water vapor barrier. The addition of LMP also allowed the formation of darker, reddish and transparent films and kept the antioxidant activity observed for LMP. Third stage shows that there is a trend towards a increase in antioxidant activity of films with an increase concentration of LMP. There was a decrease in TBARS index with storage time. In addition, the identification of 30 phenolic compounds in meat samples, 7 of which were present at all times and sampling: pentadecane, octadecane, hexanal, heptanal, octanal, nonanal of decanal, with a decrease in the areas of the relative peaks - hexanal, heptanal, octanal and decanal of the samples stored in the active films. The color of the meat showed an expected behavior ranging from bright red to brown during storage, with no difference between treatments. It is suggested that the addition of 0.50% (w/w) of LMP is the ideal concentration for its performance as reinforcement and antioxidant material in WPI films produced by casting.

Keywords: Lignin. WPI. Food Packaging. Characterization. Active Film.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Primeira parte

Figura 1 - Representação esquemática das estruturas das unidades da lignina (a) e da molécula de lignina (b).....23
Figura 2 - Etapas de desenvolvimento da autooxidação.....29

Segunda parte

Artigo 1

Figura 1 – XRD patterns of lignin and lignin microparticle (LMP).....49
Figure 2 - FTIR spectra of lignin and lignin microparticle (LMP).....51
Figure 3 - Micrographs obtained by scanning electron microscopy of lignin (a) and lignin microparticles LMP (b) at 1000x magnification.....53
Figure 4 - TG and DTG thermograms of lignin and lignin microparticles.....54

Artigo 2

Figura 1 - Difratogramas da MPL (a) e biopolímeros de IPS controle FC (b) e adicionados de 0,25 (MPL2, c), 0,50 (MPL5, d) e 0,75% (MPL7, e) de MPL com seus respectivos índices de cristalinidade (Ic).....69
Figura 2 - Espectros de FTIR de IPS (a) e MPL (b) puros e biopolímeros de IPS controle FC (c) e adicionados de 0,25 (MPL2, d), 0,50 (MPL5, e) e 0,75% (MPL7, f) de MPL.....70
Figura 3 - Micrografias de superfície (500x) e interior (200x) de biopolímeros de IPS controle FC (a.1 e a.2) e adicionados de 0,25 (MPL2; b.1 e b.2), 0,50 (MPL5; c.1 e c.2) e 0,75% (MPL7; d.1 e d.2) de MPL.....71
Figura 4 - Curvas de TGA (a) e DTG (b) de biopolímeros de IPS controle FC e adicionados de 0,25 (MPL2), 0,50 (MPL5) e 0,75% (MPL7) de MPL.....73
Figura 5 - Imagem de biopolímeros de IPS controle (C) e adicionados de 0,25 (LMP2), 0,50 (LMP5) e 0,75% (LMP7) de MPL.....79
Figura 6 - Atividade antioxidante pela redução do complexo fosfomolibdênio de biopolímeros de isolado proteico de soro de leite (IPS) controle (FC) e incorporados de 0,25 (MPL2), 0,50 (MPL5) e 0,75% (MPL7) de MPL.....81

Artigo 3

Figura 1 - Atividade de sequestro de radicais livres DPPH$^{\bullet}$ dos biopolímeros de IPS controle FC e adicionados de 0,25 (MPL2), 0,50 (MPL5) e 0,75% (MPL7) de MPL.....95
Figura 2 - Atividade antioxidante (%) pelo sistema β-caroteno/ácido linoleico de biopolímeros de IPS controle FC e adicionados de 0,25 (MPL2), 0,50 (MPL5) e 0,75% (MPL7) de MPL....96

Figura 3 - Valores de TBARS para carne moída acondicionadas sem (C) e com biopolímeros de IPS controle FC e adicionados de 0,25 (MPL2), 0,50 (MPL5) e 0,75% (MPL7) de MPL.....97
Figura 4 - Área relativa dos picos (10^3) dos compostos voláteis hexanal (a), heptanal (b) em amostras de carne moída sem (C) e com biopolímeros de IPS controle FC e adicionados de 0,25 (MPL2), 0,50 (MPL5) e 0,75% (MPL7) de MPL.....102
Figura 5 - Área relativa dos picos (10^3) do composto volátil decanal em amostras de carne moída sem (C) e com biopolímeros de IPS controle FC e adicionados de 0,25 (MPL2), 0,50 (MPL5) e 0,75% (MPL7) de MPL.....104
Figura 6 - Valores de a^* (a) e C^* (b) para as amostras de carne moída sem (C) e com biopolímeros de IPS controle FC e adicionados de 0,25 (MPL2), 0,50 (MPL5) e 0,75% (MPL7) de MPL.....105
Figura 7 - Imagens das amostras de carne moída acondicionadas em diferentes biopolímeros.....107

LISTA DE TABELAS

Segunda parte

Artigo 1

Table 1 Location of the maximum peak for lignin and LMP in XRD patterns and mean size of the ordered domain from Gaussian method……..….49

Table 2 Thermal behavior of lignin and LMP by the thermogravimetric analysis……..…55

Table 3 DPPH free radical scavenging activity of different concentrations (mg L^{-1}) of lignin, lignin microparticle (LMP), and BHT in DPPH/methanol solution after 30 minutes of reaction……..…56

Artigo 2

Tabela 1 Comportamento térmico dos biopolímeros IPS controle (FC) e adicionados de 0,25 (MPL2), 0,50 (MPL5) e 0,75% (MPL7) de MPL.....73

Tabela 2 Temperatura de transição vítrea dos biopolímeros IPS controle (FC) e adicionados de 0,25 (MPL2), 0,50 (MPL5) e 0,75% (MPL7) de MPL.....75

Tabela 3 Valores dos parâmetros de resistência mecânica dos biopolímeros IPS controle (FC) e adicionados de 0,25 (MPL2), 0,50 (MPL5) e 0,75% (MPL7) de MPL.....76

Tabela 4 Permeabilidade ao vapor de água (PVA) de biopolímeros IPS controle (FC) e adicionados de 0,25 (MPL2), 0,50 (MPL5) e 0,75% (MPL7) de MPL.....77

Tabela 5 Propriedades ópticas dos biopolímeros IPS controle (FC) e adicionados de 0,25 (MPL2), 0,50 (MPL5) e 0,75% (MPL7) de MPL.....79

Artigo 3

Tabela 1 Áreas dos picos relativos (10^3) dos compostos voláteis identificados nas carnes. Cada valor é a média de suas áreas durante os 4 dias de armazenamento.....100

Tabela 2 Valores de *L**, *b**, *h*, % MMb e %OMb de carne moída embalada em diferentes biopolímeros. Cada valor é a média de cada parâmetro durante os 4 dias de armazenamento para todos os tratamentos.....106

LISTA DE SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância
CPS	Concentrado Proteico de Soro de Leite
DIC	Delineamento Inteiramente Casualizado
DSC	Calorimetria Diferencial de Varredura
DXR	Difração de raios-X
DTG	Derivada Termogravimétrica
FTIR	Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier
IPS	Isolado Proteico de Soro de Leite
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MPL	Micropartícula de lignina
LMP	Lignin microparticle
TGA	Análise Termogravimétrica
WPI	Whey Protein Isolate
XRD	X-ray difraction

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE 15
1 INTRODUÇÃO 15
2 REFERENCIAL TEÓRICO 18
2.1 Embalagens plásticas e o meio ambiente.....18
2.2 Polímeros biodegradáveis.....18
2.3 Soro de leite e IPS 19
2.4 Biopolímeros de IPS.....21
2.5 Lignina 21
2.5.1 Lignina em escala reduzida 25
2.6 Embalagens ativas 27
2.6.1 Embalagens ativas antioxidantes 28
2.7 Carne bovina moída 30
2.8 Produção de filmes por *casting*.....32
3 CONSIDERAÇÕES FINAIS 34
4 CONCLUSÃO GERAL 35
REFERÊNCIAS 36
SEGUNDA PARTE – ARTIGOS 43
ARTIGO 1 Development and characterization of lignin microparticles for physical and antioxidant enhancement of biodegradable polymers …….....43
ARTIGO 2 Biopolímeros de isolado proteico de soro de leite / micropartículas de lignina para valorização de resíduos.....60
ARTIGO 3 Estudo da aplicação de biopolímeros ativos de IPS e micropartícula de lignina no controle da oxidação lipídica de carne moída.....87

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

As embalagens plásticas apresentam diversas características desejáveis tanto para a indústria quanto para os consumidores, sendo as principais: baixo custo, versatilidade e resistência. Porém, elas também são derivadas de fonte não renovável (petróleo) e consideradas como não biodegradáveis devido ao longo período que necessitam para serem decompostas pelo meio ambiente. Sendo assim, diversos estudos vêm sendo desenvolvidos com o objetivo de se otimizar novos materiais de embalagens que supram a demanda sustentável. As principais vias exploradas hoje em dia compreendem o uso de polímeros biodegradáveis obtidos através de fontes renováveis ou de materiais recicláveis, contribuindo dessa forma para a diminuição do impacto ambiental decorrente do uso em grande escala das embalagens plásticas.

Polímeros biodegradáveis são capazes de sofrer rápida decomposição pelos micro-organismos presentes no ambiente. Os estudos sobre a formação de polímeros biodegradáveis englobam uma variedade de fontes, sendo as mais estudadas: derivadas de fontes naturais como os polissacarídeos (amido, celulose, quitosana, gomas), proteínas (caseína, gelatina, colágeno, zeína, proteína de soja, glúten, isolado proteico de soro de leite) e lipídeos (ceras, gorduras e óleos) ou sintéticas produzidas a partir de monômeros naturais e/ou monômeros sintéticos e micro-organismos (ácido poliláctico, pululana e xantana).

O isolado proteico de soro de leite (IPS) é um material promissor no desenvolvimento de filmes biodegradáveis para aplicação em alimentos por ser derivado do soro de leite, um coproduto da indústria de queijos e caseína, sendo interessante do ponto de vista ambiental e econômico. Além disso, estudos com IPS demonstram que o material apresenta facilidade na formação de emulsões, géis e filmes, contribuindo em seu processamento, e os polímeros resultantes com excelentes propriedades de barreira (oxigênio e aromas), transparência e elevado valor nutricional (para filmes comestíveis). Porém, esses filmes também apresentam baixa resistência à tração e alta permeabilidade ao vapor de água, comparados aos plásticos normalmente utilizados em alimentos, como o policloreto de vinila (PVC), e baixa barreira à luz, o que pode dificultar sua utilização em alimentos.

A utilização de micro e nanopartículas de diferentes tipos de materiais vem sendo estudada na tentativa de melhorar as propriedades citadas para IPS, com resultados bastante promissores. Dentre os materiais e propriedades estudadas tem-se: nanoargila com aumento da barreira ao vapor de água dos filmes; montmorilonita com aumento da barreira ao oxigênio,

resistências mecânica e térmica, nanofibra de celulose, com melhoria da resistência mecânica, nanopartículas de dióxido de titânio com aumento da elasticidade e zeína com melhoria na resistência mecânica dos filmes, dentre outros (AZEVEDO et al., 2015a; CARVALHO et al., 2018; ZUBAIR; ULLAH, 2020).

A lignina é o segundo maior componente da madeira. É obtida como um coproduto da indústria de celulose e papel como fonte de energia, e por ser amplamente disponível, apresenta baixo custo. Por apresentar excelentes propriedades químicas e físicas, tem grande potencial de substituição aos materiais derivados do petróleo. A micro ou nanopartícula de lignina (MPL) também vêm sendo estudada e quando comparada à lignina em macroescala, a MPL apresenta maior área superficial específica e por isso sua atuação como material de reforço nas propriedades físicas e antioxidantes de diferentes matrizes poliméricas é intensificada. A MPL pode ser obtida através de tratamento mecânico que possui a vantagem de ser uma metodologia simples, rápida e com bons resultados.

A utilização de MPL de lignina foi demonstrada em filmes de diferentes bases poliméricas como PLA acarretando melhoria das propriedades óticas, térmicas e mecânicas e em compósitos de borracha acarretando aumento das propriedades térmicas e mecânicas dos materiais (JIANG et al., 2013; YANG et al., 2016a). Ela também vem sendo estudada por sua ação antioxidante em filmes de quitosana, celulose, PVA, PBAT, dentre outros (CROUVISIER-URION et al., 2016; FAROOQ et al., 2019; HE et al., 2019; XING et al., 2019). Estudos sobre o desenvolvimento de filmes de IPS e MPL ainda não são encontrados na literatura.

Um dos problemas enfrentados pela indústria de alimentos diz respeito à vida útil de seu produto, que pode sofrer interferência pela atuação de micro-organismos e de reações de oxidação. O desenvolvimento de embalagens ativas de alimentos é uma alternativa para o aumento da vida útil desses alimentos, em que um material recebe um agente ativo que é liberado quando em contato com a matriz alimentícia. A atuação deste agente ativo é preferencialmente de forma prolongada devido à liberação controlada e linear no decorrer do tempo, acarretando a manutenção de suas características iniciais. A procura dos consumidores por alimentos mais naturais tem incentivado a pesquisa e desenvolvimento de embalagens com adição de antioxidantes naturais como: ácido cítrico, ácido ascórbico, ácido acético, extrato de chá verde, semente de uva, gengibre, óleo essencial de orégano, tomilho, alecrim, alho, limão, canela, lignina, dentre muitos outros. Sendo assim, o objetivo geral deste trabalho foi de desenvolver micropartículas de lignina e com elas, filmes biodegradáveis ativos de IPS pelo método *casting* e estudar o efeito antioxidante desses filmes no armazenamento de carne moída.

Os objetivos específicos deste estudo foram: desenvolver micropartículas de lignina a partir de lignina derivada da indústria de celulose (*kraft*) e caracterizá-las quanto às propriedades estruturais, morfológicas, térmicas e antioxidantes (artigo 1); Estudar o efeito da adição dessas micropartículas de lignina como material de reforço e antioxidante em filmes de IPS (artigo 2) e verificar o efeito antioxidante dos biopolímeros ativos decorrente de sua aplicação em carne moída (artigo 3).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Embalagens plásticas e o meio ambiente

Os materiais plásticos derivados do petróleo vem sendo amplamente utilizados desde a metade do século XX devido a suas características de baixo custo, versatilidade de uso e produção, aparência e elevadas propriedades físico-químicas como transparência e durabilidade. Cerca de 20% de todo esse plástico disponível mundialmente é utilizado na produção de embalagens de alimentos como filmes, folhas, garrafas, copos, bandejas, dentre outros (RHIM; PARK; HA, 2013). Segundo o último levantamento feito pela Associação Brasileira da Indústria do Plástico (ABIPLAST), por meio Tabela de Recursos e Usos do IBGE, no ano de 2016 o setor de alimentos ocupou a segunda posição no hanking dos principais setores consumidores de produtos plásticos no Brasil, atrás apenas do setor de construção civil, com uso de 20,2% do total de plástico produzido e utilizado pelos diversos setores de serviços (ABIPLAST, 2018).

Os filmes plásticos são amplamente utilizados pela indústria de alimentos apresentando grande leque de utilização como no recobrimento de frutas e hortaliças, alimentos minimamente processados, produtos de confeitaria (pães, bolos, biscoitos), e alimentos já porcionados como carnes, queijos, frios, dentre outros. Os objetivos da utilização dos filmes no recobrimento desses alimentos incluem proteger fisicamente o alimento, reduzir trocas de umidade e gases (como O2 e CO2) entre o produto e o ambiente, reduzir da migração de lipídeos do alimento para a embalagem, além de poderem atuar no aumento da qualidade e vida útil do alimento por permitirem a incorporação de aditivos como antioxidantes, agentes antifúngicos, antimicrobianos, de cor e outros nutrientes (RHIM; NG, 2007).

Porém, por serem derivados de fonte fóssil (petróleo), um recurso não renovável, e por apresentarem lenta degradação pelo ambiente (não biodegradáveis), os filmes e materiais plásticos constituem um problema ambiental pois ainda são descartados de forma inadequada em mares, rios e florestas, ou ainda queimados a céu aberto. Além disso, as empresas de reciclagem desses materiais ainda são deficientes para o total de material descartado, apesar de crescer em número a cada ano (ABIPLAST, 2018). Assim, esforços são realizados na busca de materiais de fontes renováveis e biodegradáveis e que sejam matérias primas na fabricação de seus substitutos (RHIM; NG, 2007; RHIM; PARK; HA, 2013; TANG et al., 2012).

2.2 Polímeros biodegradáveis

De acordo com a “American Society Standard Testing and Materials” (ASTM D833-46, 1955), polímeros biodegradáveis são “aqueles que apresentam quebra das ligações químicas em suas cadeias poliméricas através de agentes biológicos, levando a uma fragmentação ou desintegração dos mesmos”. Sob condições adequadas de umidade, temperatura e disponibilidade de oxigênio, a biodegradação leva a desintegração dos plásticos sem a formação de resíduos tóxicos ou maléficos ao meio ambiente (RHIM; PARK; HA, 2013). Sendo assim, polímeros biodegradáveis vêm sendo amplamente estudados e considerados como potenciais substitutos aos materiais plásticos por apresentarem os benefícios de biodegradabilidade e serem derivados total ou parcialmente de fontes renováveis.

Os polímeros biodegradáveis podem ser divididos em dois grupos com base em sua origem: sintéticos ou naturais. Os sintéticos são aqueles produzidos através da síntese química, podendo ser utilizados monômeros apenas de origem natural ou a mistura de monômeros naturais e de petróleo e ainda os sintetizados ou encontrados em micro-organismos. Como exemplo têm-se os poliésteres, polianidretos, poliuretanos, poliaminoácidos, pululana, dentre outros. Os de origem natural são diretamente extraídos da biomassa, como os polissacarídeos e proteínas (DOPPALAPUDI et al., 2014).

Como exemplo das bases poliméricas naturais e sintéticas mais estudadas na formação de filmes para alimentos podem-se citar o amido, quitosana, celulose, gelatina, poliésteres, polilactatos (PLA), poliaminoácidos, polihidróxibutirato (PHB), isolado proteico de soja, isolado proteico de soro de leite (IPS), entre outros (AZEVEDO et al., 2015b, 2019; CARVALHO et al., 2018; DIAS et al., 2014; EL-NEMR et al., 2019).

2.3 Soro de leite e IPS

A Portaria de número 53/2013 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), que se encontra em fase de aprovação, cria o “Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Soro de Leite” e define esse produto como sendo “o líquido obtido a partir da coagulação do leite destinado a fabricação de queijos, caseína ou produtos lácteos similiares” (BRASIL, 2013, p.6).

O soro de leite é um líquido de cor amarelo-esverdeado, considerado rico nutricionalmente por conter grande variedade de micro e macronutrientes como cálcio, magnésio, vitaminas do complexo B, lipídeos, lactose e proteínas. De todos esses nutrientes destacam-se principalmente as proteínas, pois cerca de 20% do total de proteínas presente no

leite permanecem no soro após o seu processamento (ANDERSON; MOORE, 2004; ZACARCHENCO et al., 2013).

Em média, para cada quilo de queijo produzido, são gerados 9kg de soro de leite, onde parte é aproveitada pela indústria de alimentos na produção de coprodutos e parte pode ser descartada de forma inadequada em rios, mares e esgoto, causando um grande problema ambiental devido à alta taxa de demanda bioquímica de oxigênio (DBO) que esse material apresenta, cerca de 100 vezes maior que a do esgoto doméstico, o que o torna então, um produto muito poluente se não for devidamente tratado (ZACARCHENCO et al., 2013).

As principais proteínas presentes no soro de leite são as β-lactoglobulinas (peso molecular de 18kDa), que contribuem com quase 57% do total de proteínas do soro de leite, α-lactoalbuminas (peso molecular de 14 kDa), albumina de soro bovino, imunoglobulinas e proteose-peptonas, que quando adicionadas a produtos alimentícios, acrescentam além de valor nutricional, propriedades funcionais tecnológicas muito desejáveis como solubilidade, emulsificação e formação de espuma (ZUBAIR; ULLAH, 2020; ORDOÑEZ, 2005). As proteínas presentes no soro de leite são consideradas de grande valor nutricional, pois apresentam em sua constituição grande variedade de aminoácidos essenciais e em excelentes concentrações. Aminoácidos essenciais são aqueles necessários ao metabolismo humano, mas que não são sintetizados por ele, sendo adquiridos por meio da alimentação. Além disso, alguns desses aminoácidos como triptofano, prolina, histidina e tirosina podem apresentar atividade antioxidante atuando na eliminação ou impedindo a formação de radicais livres seja pela doação de elétrons e/ou prótons ou ainda pela presença de grupamentos sulfidrilas (DE SOUZA et al., 2019; MOHANTY et al., 2016).

Como exemplos de coprodutos derivados do soro de leite podem-se citar: soro de leite em pó, concentrado proteico de soro de leite (CPS), isolado proteico de soro de leite (IPS), bebidas lácteas, doce de leite, sorvetes, lactose, entre outros. Dentre esses produtos, o CPS e IPS podem ser obtidos por meio da separação da lactose por ultrafiltração, evaporação e liofilização com formação de um produto com baixa quantidade de lactose e gordura e alta concentração das proteínas. O CPS pode apresentar teores de proteína de 35%, 75% e 80% e o IPS com teor proteico variando de 85-90%, além disso, o teor de lactose no CPS é maior que o encontrado no IPS (SMITHERS, 2008).

Por isso, levando em consideração seu alto valor nutricional, propriedades funcionais e tecnológicas, o soro de leite e seus derivados (CPS e IPS) vem sendo amplamente estudados na formulação de alimentos e de outros produtos para o setor alimentício, como filmes biodegradáveis. Soma-se a essas vantagens, o fato de o soro de leite apresentar baixo custo, por

ser um coproduto da indústria, e sua utilização também pode atuar contribuindo para a redução do impacto ambiental que o descarte inadequado desse produto pode acarretar.

2.4 Biopolímeros de IPS

As proteínas do soro de leite têm disso utilizadas como base polimérica na produção de filmes biodegradáveis apresentando resultados promissores. O IPS é capaz de formar filmes flexíveis e transparentes, sendo facilmente removidos durante o processo de produção por casting. Além disso, seus filmes podem impedir mudanças na qualidade dos alimentos contribuindo no aumento de sua vida útil, por apresentarem boa barreira à gases, aromas e gorduras quando comparados à filmes de polissacarídeos e lipídeos (ZUBAIR; ULLAH, 2020). Em contrapartida, devido ao alto conteúdo de aminoácidos hidrofílicos presentes nas proteínas do IPS, esses filmes tendem a apresentar reduzida resistência mecânica e baixa barreira à umidade. Como uma das soluções, o glicerol é utilizado como agente plastificante ajudando a controlar a maleabilidade, propriedades de barreira e consequente vida útil dos filmes (AZEVEDO et al., 2015a, 2019; CARVALHO et al., 2018; KOKOSZKA et al., 2010; RAMOS et al., 2013).

Outro caminho utilizado em pesquisas para se aumentar não só as propriedades mecânicas e de barreira, mas incluir propriedades antioxidante e antimicrobianas aos filmes de IPS é a utilização de agentes de reforço. Como exemplo de agentes de reforço capazes de melhorar propriedades mecânicas, de barreira ao vapor de água, térmicas, solubilidade, dentre outras, em filmes de IPS, tem-se a montmorilonita, ácido cítrico, nanofibra de celulose, lactato de sódio, goma de mesquita, dióxido de titânio, argila, óleos essenciais de diferentes espécies, etc (AZEVEDO et al., 2015a; CARVALHO et al., 2018; OSÉS et al., 2009; SEYDIM; SARIKUS, 2006; SOTHORNVIT et al., 2010; ZINOVIADOU; KOUTSOUMANIS; BILIADERIS, 2010; ZOLFI et al., 2014).

2.5 Lignina

A palavra lignina vem do latim lignum que significa madeira. Depois da celulose, a lignina é o segundo maior componente da madeira, compondo cerca de 10 a 25% da massa lignocelulósica total. A lignina faz a junção entre a celulose e hemicelulose nas plantas e é de origem renovável, com excelentes propriedades químicas e físicas sendo obtida a um custo acessível como subproduto da indústria de celulose, papel e biorefinarias de etanol. Ultimamente vem sendo estudada como substituta de produtos derivados de fonte fóssil. Dentre as várias áreas em que ela vem sendo usada, destacam-se aplicações em: combustíveis, biocidas,

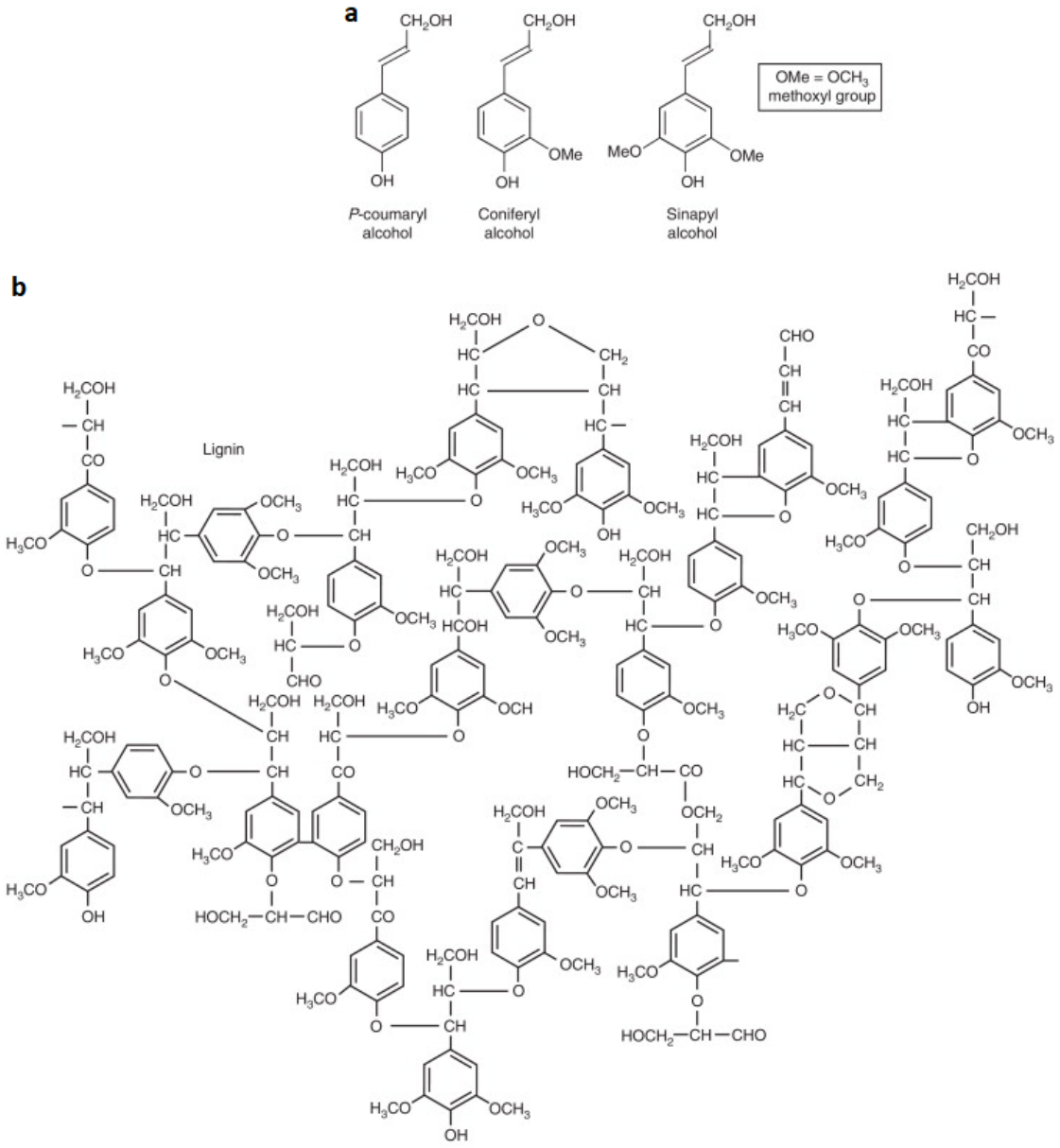
produtos químicos, aditivos para papel e concreto, dispersantes, cosméticos, tintas, polímeros, dentre outros (DOMENEK et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2001; SPIRIDON et al., 2018; WATKINS et al., 2015).

A lignina é uma macromolécula tridimensional (Figura 1) altamente reticulada composta de três principais monômeros fenólicos: álcool coniferílico, álcool sinapílico e álcool ρ-cumarílico, unidas entre si através de polimerização enzimática com formação de ligações aromáticas e alifáticas e também ligações não aromáticas C-C (VANHOLME et al., 2010; WATKINS et al., 2015). Sua estrutura é complexa, contendo polímeros fenólicos reticulados, numerosos grupos funcionais como hidroxilas alifáticas e fenólicas e grupamentos metóxi. Assim, ela se apresenta como um composto fenólico amorfo, altamente ramificado e sua estrutura química pode variar bastante de acordo com sua origem botânica, período de colheita e processo de extração (RAMEZANI; SAIN, 2018; SATHAWONG; SRIDACH; TECHATO, 2018).

Oliveira et al. (2001) cita a classificação da lignina proposta por LaPierre (1993) que tem como base sua susceptibilidade à hidrólise. Segundo o autor, a lignina pode ser classificada em core e não core, sendo a core constituída de polímeros fenilpropanóides da parede celular, altamente condensados e muito resistentes à degradação e a não core constituída de compostos fenólicos de baixo peso molecular, liberados da parede celular por hidrólise, representada por ácidos ρ-hidroxicinâmico éster-ligados.

Outros estudos também classificam a lignina em três grupos dependendo da sua origem: lignina de coníferas (*softwood*), de folhosas (*hardwood*) ou de grama ou capim (*grass*). A primeira é chamada de lignina guaiacil e consiste majoritariamente de álcool coniferílico e pequenas quantidades de álcool sinapílico, como exemplo tem-se a lignina de pinheiro. A segunda é conhecida como lignina guaiacil-siringil e é constituída de álcool coniferílico e álcool sinapílico, mas em proporções diferentes, como exemplo tem-se a lignina derivada de eucalípto. E a terceira também pode ser chamada de lignina guaiacil-siringil porém é constituída em sua maioria de unidades derivadas de álcool ρ-cumarilico (NASEEM et al., 2016).

Figura 1 - Representação esquemática das estruturas das unidades da lignina (a) e da molécula de lignina (b).



Fonte: Watkins et al. (2015).

A lignina pode ser extraída por diferentes métodos (enzimático, químico e mecânico), por exemplo, processo sulfito, soda, kraft, por hidrólise, dentre outros. Os principais tipos de lignina disponíveis são a lignina kraft, lignosulfonatos, lignina organosolvidas e ligninas derivadas de biorefinarias. Cada uma difere em sua estrutura química, peso molecular e pureza, que vão determinar sua solubilidade e características sensoriais (SIPPONEN et al., 2019). A lignina obtida através de processamento kraft corresponde a cerca de 85% do total produzido e normalmente é utilizada como combustível, sendo queimada para a produção de energia. Ela é

obtida por fragmentação e condensação química durante o processamento de celulose (NASEEM et al., 2016).

Por ser natural, biodisponível e apresentar baixo custo, a utilização de lignina como constituinte da matriz polimérica de biopolímeros para aplicação em alimentos vem sendo estudada com resultados positivos em suas propriedades.

Diversos estudos demonstram a eficácia da utilização de lignina na produção de filmes biodegradáveis, com reforço sobre suas propriedades mecânicas (KOVALCIK et al., 2015; LE DIGABEL; AVÉROUS, 2006; SHANKAR; REDDY; RHIM, 2015), aumento da barreira à luz U.V (SIPPONEN et al., 2019), diminuição da permeabilidade à água, oxigênio e dióxido de carbono (KOVALCIK et al., 2015; SHANKAR; REDDY; RHIM, 2015), aumento da estabilidade térmica (SAMAL et al., 2014), atuação como agente plastificante (MIRANDA et al., 2015) e também incorporação de atividade antioxidante aos filmes (DOMENEK et al., 2013).

Apesar de a maioria das ligninas ser solúvel em água apenas em pH alcalino (BEISL; MILTNER; FRIEDL, 2017), sendo uma limitação em sua aplicação, estudos demonstram melhoria das propriedades físicas dos filmes pela adição de lignina provavelmente devido à afinidade que esse composto apresenta a uma variedade de bases poliméricas. Dentre elas podemos citar: ágar, ácido poliláctico (PLA), amido, 3-hidroxibutirato-co-3-hydroxivalerato (PHBHV), polietileno, dentre outros (DOMENEK et al., 2013; KOVALCIK et al., 2015; MIRANDA et al., 2015; NAIK; ROZMAN; BHAT, 2013; SAMAL et al., 2014; SHANKAR; REDDY; RHIM, 2015; YANG et al., 2016b).

A ação antioxidante da lignina pode ser explicada pela sua estrutura aromática e resíduos fenólicos que dão a ela a capacidade de sequestro de radicais livres, seguindo o mecanismo geral dos compostos fenólicos, onde os grupamentos hidroxila fenólicos em presença de radicais livres, atuam como doadores de prótons, estabilizando esses radicais (DOMENEK et al., 2013). Estudos confirmam a atividade antioxidante da lignina proveniente de diferentes fontes vegetais como o bambu (GONG et al., 2016), palma (CORAL MEDINA et al., 2016), choupo (PAN et al., 2006), casca de arroz (SALANTI et al., 2010) dentre outros. Ainda, parece ser um consenso entre as pesquisas de que a atividade antioxidante da lignina está relacionada positivamente à maior quantidade dos grupamentos hidroxila e baixo peso molecular sendo afetada negativamente pelo aumento da heterogeneidade da molécula e por sua dispersão, pois quanto mais heterogênea for a molécula, como por exemplo com a presença de hemicelulose, menor a exposição dos grupamentos fenólicos com atividade antioxidante na superfície da

mesma, e quanto maior a concentração de lignina, maior a atração entre suas próprias moléculas e menor sua dispersão.

2.5.1 Lignina em escala reduzida

A produção de lignina em micro e nanoescala ganhou interesse dos pesquisadores nos últimos anos principalmente por esses materiais oferecerem propriedades únicas pelo aumento de sua área superficial. Isso acontece pois as interações químicas e físicas da estrutura são governadas por suas propriedades de superfície. Sendo assim, um material em escala micro ou nanométrica pode apresentar propriedades consideravelmente diferentes do mesmo material em maior dimensão (BEISL; MILTNER; FRIEDL, 2017).

De modo geral, nanopartículas são classificadas como estruturas que possuem pelo menos uma de suas dimensões entre 1 – 100 nanômetros, porém o que se vê na prática é uma falta de consenso entre pesquisadores, sendo comum a utilização de valores que vão de poucos nanômetros a poucos micrometros no estudo e caracterização dessas partículas (BEISL; MILTNER; FRIEDL, 2017; JELINEK, 2015).

Micro e nanopartículas de lignina podem ser classificadas de acordo com sua geometria em partícula, lamela ou material fibroso e no caso da lignina, o tipo de metodologia utilizada e fonte da lignina serão capazes de desenvolver tipos diferentes de geometria (BEISL; MILTNER; FRIEDL, 2017). Elas podem ser produzidas a partir de diferentes fontes de lignina como palha de trigo, grama, madeira de eucalipto, dentre outros (GILCA; POPA; CRESTINI, 2015; YANG et al., 2016b) e também com utilização de diferentes metodologias como mudança de solvente ou pH, polimerização, tratamento mecânico, segregação por gelo, dentre outros (BEISL; MILTNER; FRIEDL, 2017; GILCA; POPA; CRESTINI, 2015). Frangville et al. (2012) utilizaram a hidrólise ácida da lignina a partir da adição de HCl e observaram a diminuição progressiva do tamanho das partículas da escala micrométrica para menos de 100nm quando o total de HCl foi adicionado. Gilca et al. (2015) utilizaram método físico para a obtenção de nanopartículas de lignina através de irradiação ultrassônica e obtiveram como resultado a diminuição do tamanho das partículas de lignina de 1-10µm para 10-50nm, confirmando a eficácia do método.

A utilização de método físico pela utilização de ultrassom para diminuição do tamanho de partícula da lignina apresenta algumas vantagens como ser uma metodologia rápida, simples e de baixo custo. Segundo Gilca et al. (2015), o desenvolvimento de quebras e reações químicas durante o processo de ultrassom está fortemente relacionado ao fenômeno chamado cavitação.

A cavitação é induzida por frequências de ondas ultrassônicas altas (16KHz-100MHz) passando pela massa do líquido. Durante esse processo, há a formação de milhões de bolhas de ar em um determinado líquido, e o ultrassom, apresentando intensidade adequada, permite o desenvolvimento de cavidades. O colapso ou a inclusão dessas cavidades cria locais de alta temperatura e pressão em um curto período de tempo, formando pontos quentes no líquido frio. O estado de transição desses locais de alta pressão e temperatura é o ativador para as primeiras reações químicas que ocorrem durante e após o colapso das microbolhas. Na presença de água e ar, os radicais hidroxila e superóxidos são formados, porém, se a intensidade e a duração do ultrassom não atingirem os níveis necessários, não haverá a formação de cavidades e em consequência a ocorrência de reações químicas no líquido. Alguns fatores influenciam a formação de radicais durante o processamento da lignina por ultrassom, sendo eles: pressão, temperatura, configuração técnica do aparelho e tipo de líquido utilizado na solução. Ainda, os radicais formados durante o processo de sonicação dependem do número de cavidades formadas e de radicais formados por cavidade. No caso de polímeros, o ultrassom leva à formação de fraturas homolíticas das cadeias macromoleculares resultando em radicais pares ou na polimerização de monômeros.

É possível a aplicação desses nanomateriais em várias áreas como na substituição de nanopartículas tóxicas, ciências médicas e de diagnósticos, produção de energia, computação molecular e reforço de polímeros (BEISL; FRIEDL; MILTNER, 2017; SIPPONEN et al., 2019). A indústria de alimentos, por outro lado, apresenta lenta adaptação a essa área da ciência, o que pode ser explicado pela crescente preferência dos consumidores a produtos “naturais” e uma ligeira preocupação em relação às nanopartículas (DUNCAN, 2011). Porém, micro e nanopartículas de lignina apresentam a vantagem de poderem ser potencialmente inofensivos aos seres humanos além de benignos ao meio ambiente por se tratar de um material natural, favorecendo a agregação de valor significativo aos materiais da indústria alimentícia (FRANGVILLE et al., 2012). Além disso, pesquisadores e indústria confirmam o grande potencial de utilização da micro e nanotecnologia no processamento de alimentos, destacando-se o setor de embalagens como o mais promissor, devido à maior aceitação dos consumidores, visto que a nova tecnologia não entra em contato direto com o alimento (DUNCAN, 2011).

A nanotecnologia aplicada a polímeros é definida como uma grande área de pesquisa, desenvolvimento e atividade industrial que envolve o projeto, fabricação, processamento e a aplicação de materiais de base polimérica preenchidos por nanopartículas (AZEREDO, 2009; SILVESTRE; DURACCIO; CIMMINO, 2011). Devido a sua grande disponibilidade, estudos vem sendo realizados avaliando a capacidade de melhora das propriedades físicas,

antioxidantes e antimicrobianas de polímeros a partir da adição de lignina em diferentes tamanhos com resultados promissores (FORTUNATI et al., 2016; SIPPONEN et al., 2019).

Yang et al. (2016a) observaram melhoria das propriedades ópticas, térmicas e mecânicas de filmes biodegradáveis de PLA com nanopartículas de lignina, com aumento do bloqueio da luz ultravioleta e elevada transparência, aumento da tendência à cristalização e do grau de cristalização e ainda, aumento da resistência à tração e módulo de Young dos biopolímeros. Jiang et al. (2013) também encontraram melhorias nas propriedades térmicas e mecânicas em compósitos naturais de borracha incorporados com nanopartículas de lignina. Eles observaram o aumento da temperatura máxima de degradação térmica (consequente aumento da estabilidade térmica) e melhora da resistência à tração e porcentagem de alongamento na ruptura a partir do aumento da concentração da nanopartícula. Núñez-flores et al. (2013) avaliaram a propriedade antioxidante de filmes de gelatina incorporados com lignina com tamanho de partícula < 210 micra e observaram o aumento da atividade antioxidante dos biopolímeros de acordo com o aumento da concentração de lignina. Ojagh et al. (2011) encontraram inibição da oxidação lipídica de filés de salmão embalados com biopolímeros de gelatina e lignina.

Sendo assim, a utilização de partículas de lignina em tamanho reduzido pode agregar valor ao biopolímero por ser um material derivado de fonte renovável, biodegradável e de baixo custo. Além disso, quando utilizado em alimentos, pode favorecer sua segurança alimentar, trazer segurança ao consumidor no que se diz respeito à interação da partícula com o alimento, além de melhorar as propriedades físicas, antioxidantes e antimicrobianas dessa embalagem.

2.6 Embalagens ativas

As funções básicas de uma embalagem de alimentos são a de isolar o alimento do ambiente externo protegendo-o de possíveis contaminações e degradação por micro-organismos, poeira, luz, gases, forças mecânicas e odores, que podem vir a modificar as características esperadas para aquele produto. Também é atribuída a ela a função de informar o consumidor sobre o tipo de produto acondicionado, ingredientes, valor nutricional, modo de preparo, dentre outros e de venda, visto que a maioria dos consumidores associa a embalagem à qualidade do produto em si (UL, 2005). Além disso, a indústria exige como propriedades básicas de uma embalagem de alimentos boas características mecânicas, ópticas, térmicas, de barreira à aromas, vapor de água e gases (como O_2 e CO_2) e que tenha nulo ou reduzido impacto ao meio ambiente (RHIM; PARK; HA, 2013).

Porém, com as mudanças contínuas nas tendências do mercado e na demanda dos consumidores atuais, exigindo cada vez mais produtos frescos, saborosos, convenientes e com prazo de validade prolongado, associados a uma qualidade controlada e satisfatória, as embalagens de alimentos passam a adquirir novas funções atreladas às já existentes (UL, 2005; YILDIRIM et al., 2018).

Começam a ser pesquisadas e desenvolvidas no mercado as embalagens ativas e inteligentes. Essas embalagens apresentam como principal característica a interação entre embalagem e produto e/ou embalagem e meio. Nas embalagens inteligentes temos o monitoramento das condições do alimento armazenado ou do ambiente externo à embalagem que indicam ao consumidor a qualidade do produto acondicionado. Já as embalagens ativas têm por objetivo a extensão da vida útil do produto, mantendo ou até mesmo melhorando sua qualidade (DAINELLI et al., 2008).

Dentre as embalagens ativas com maior potencial de utilização pela indústria de alimentos estão as absorvedoras e emissoras de compostos. Como absorvedoras estão as de oxigênio, umidade e gás etileno e temos como emissoras as de antioxidantes, dióxido de carbono e antimicrobianos (YILDIRIM et al., 2018).

Dessa forma, atualmente as embalagens ativas têm ganhado espaço e atenção, pois além de oferecerem as proteções básicas de uma embalagem de alimentos também acrescentam funções que permitem a melhora da qualidade do produto e de sua vida útil, aumentando o interesse dos consumidores e consequente compra do produto (PEREIRA DE ABREU; CRUZ; PASEIRO LOSADA, 2012).

2.6.1 Embalagens ativas antioxidantes

As embalagens ativas com propriedades antioxidantes são estudadas e aplicadas em alimentos que apresentam alto teor de lipídeos como peixe e carnes *in natura*, alimentos desidratados com alto teor de lipídeos, sementes, oleaginosas, óleos e produtos fritos (YILDIRIM et al., 2018). Isso porque a oxidação é um dos principais fatores de deterioração de alimentos que contenham lipídeos, provocando redução de seu valor nutritivo pela perda de ácidos graxos essenciais e ainda levando a formação de substâncias possivelmente tóxicas ao organismo. O principal substrato da oxidação são os ácidos graxos insaturados, sendo as duplas ligações, centros ativos que podem reagir com o oxigênio (ORDOÑEZ, 2005).

A oxidação lipídica pode ocorrer por meio das vias de fotoxidação, autoxidação e oxidação enzimática. A fotoxidação se dá pela reação de ácidos graxos insaturados com a radiação UV na presença de sensibilizadores (ex: clorofila, mioglobina) e oxigênio como

intermediário reativo, com formação de hidroperóxidos (produtos primários da degradação) e aldeídos, álcoois e hidrocarbonetos (produtos finais da degradação) (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010).

A autoxidação é um processo que evolui ao longo do tempo, podendo-se distinguir três etapas (CHLOE; MIN, 2006): iniciação, propagação e término (Figura 2).

Figura 2 Etapas de desenvolvimento da autooxidação.

Iniciação	RH	$\rightarrow$	$R^{\bullet} + H^{\bullet}$
Propagação	$R^{\bullet} + O_2$	$\rightarrow$	$ROO^{\bullet}$
	$ROO^{\bullet} + RH$	$\rightarrow$	$ROOH + R^{\bullet}$
Término	$ROO^{\bullet} + R^{\bullet}$	$\rightarrow$	$ROOR$
	$ROO^{\bullet} + ROO^{\bullet}$	$\rightarrow$	$ROOR + O_2$
	$R^{\bullet} + R^{\bullet}$	$\rightarrow$	RR

Fonte: Chloe & Min (2006).

(RH = ácido graxo insaturado; $R^{\bullet}$ = radical livre; $ROO^{\bullet}$ = radical peróxido; ROOH = radical hidroperóxido).

Na etapa de iniciação ocorre a formação de radicais livres resultantes da retirada do átomo de hidrogênio do carbono alilico da molécula de ácido graxo, sendo a reação acelerada na presença de catalisadores metálicos como o cobre e ferro, e na presença de enzimas, luz e calor. Na etapa de propagação, os radicais livres (susceptíveis ao ataque de oxigênio) atuam como propagadores da reação e são convertidos em produtos primários da oxidação lipídica (peróxidos e hidroperóxidos). No final da reação, os radicais combinam-se formando produtos estáveis, chamados produtos secundários (alcanos, alcenos, aldeídos e cetonas), obtidos por cisão e rearranjo dos peróxidos (CHLOE; MIN, 2006).

Para a oxidação enzimática tem-se a atuação da enzima lipoxigenase, com formação de peróxidos e hidroperóxidos com duplas ligações e semelhante ao processo de autooxidação, podendo formar diversos produtos, com a diferença de ser mais específico quanto ao substrato e produtos da oxidação (SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999).

Antioxidantes são definidos como substâncias que, presentes em concentrações menores que do substrato oxidável atuam no retardo da oxidação com diminuição da rancificação e formação de compostos *off flavors* e consequente deterioração do produto (KAUR; KAPOOR,

2001). Eles podem ser classificados em dois grupos: primários e secundários. Os primários atuam interrompendo a cadeia de radicais por ceder hidrogênio a um radical lipídico livre e assumindo a forma de radical estável e como exemplo de antioxidante deste grupo temos os compostos fenólicos. Os secundários diminuem o processo de iniciação, pois utilizam agentes quelantes de metais que podem ser catalisadores da reação de oxidação, como exemplo dessa classe de antioxidantes tem-se o ácido cítrico (SHAHIDI; JANITHA; WANASUNDARA, 1992).

Para resolver o problema de oxidação dos alimentos embalados de forma convencional, ou seja, utilizando-se embalagens que não interagem com o produto, a indústria de alimentos opta por adicionar antioxidantes sintéticos diretamente ao alimento. Como exemplo dos antioxidantes sintéticos utilizados tem-se o butil-hidroxi-anisol (BHA), butil-hidroxi-tolueno (BHT) e terc-butilhidroquinona (TBHQ) (AMARAL; SOLVA; LANNES, 2018; KAUR; KAPOOR, 2001). Porém, a procura dos consumidores por alimentos mais naturais aumenta a pesquisa e desenvolvimento de antioxidantes naturais que possam ser adicionados a esses alimentos e também à suas embalagens, tais como: ácido cítrico, ácido ascórbico, ácido acético, extrato de chá verde, semente de uva, gengibre, óleo essencial de orégano, tomilho, alecrim, alho, limão, canela, dentre muitos outros (AZEVEDO et al., 2019; CARVALHO et al., 2019; GÓMEZ-ESTACA et al., 2014; YILDIRIM et al., 2018).

Antioxidantes naturais são aqueles extraídos de vegetais, plantas, micro-organismos e tecidos animais. Sua ação é proveniente dos diversos compostos fenólicos presentes, que além se serem antioxidantes também podem exibir ações fisiológicas interessantes como anti-alergênica, anti-arteriogênica, anti-inflamatória, antimicrobiana, vasodilatadora, entre outras (ANDREO; JORGE, 2007; KAUR; KAPOOR, 2001).

Sendo assim, as embalagens ativas antioxidantes apresentam grande potencial para aplicações comerciais, principalmente aquelas onde são utilizados antioxidantes naturais.

2.7 Carne bovina moída

A carne bovina é um dos alimentos mais consumidos pela população mundial e apresenta elevado valor nutricional, sendo fonte de proteínas de alto valor biológico, vitaminas hidrossolúveis como as vitaminas do complexo B, minerais e compostos bioativos (FAUSTMAN et al., 2010). Desde o fim de 2018, o Brasil ocupa o primeiro lugar no ranking de exportação de carne bovina do mundo, com valor total de exportação de mais de 1,5 milhão de toneladas no ano de 2017 (ASSOCIAÇÃO BRASILERIA DAS INDÚSTRIAS EXPORTADORAS DE CARNE - ABIEC, 2017; BRASIL, 2017).

A carne *in-natura* é a definida como a carne de animais abatidos recentemente, bem como carnes embaladas a vácuo ou sob atmosfera modificada, que não possuem nenhum outro tratamento além de resfriamento para garantir sua preservação (ZHOU; XU; LIU, 2010). A carne *in-natura* é um alimento altamente perecível devido à sua composição química com alto teor de nutrientes e atividade de água, favorecendo o crescimento microbiano, principal fator de sua deterioração (TORNUK et al., 2015). Além deste fator, a oxidação lipídica e de pigmentos também é causa de sua deterioração, podendo ocorrer inclusive em carnes armazenadas sob refrigeração, contribuindo para a diminuição de suas características sensoriais como odor, sabor, aroma, cor e textura, com consequente diminuição da aceitabilidade do alimento pelo consumidor (RAMOS & GOMIDE, 2017; FAUSTMAN et al., 2010).

Segundo a Instrução Normativa nº 83 de 21 de novembro de 2003 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2003, p. 29), a carne bovina moída pode ser definida como o produto cárneo obtido a partir da moagem de massas musculares de carcaças de bovinos, seguido de imediato resfriamento ou congelamento. Quando resfriado, o produto deve ser mantido à temperatura de 0°C a 4°C e congelado à temperatura máxima de -18°C. A moagem da carne aumenta seu risco de contaminação, oxidação e consequente degradação devido ao aumento de sua superfície de contato, liberação de exudado celular durante a fragmentação do tecido e maior manipulação durante o preparo (DE OLIVEIRA et al., 2008).

A oxidação lipídica da carne começa no momento do abate, quando o fluxo sanguíneo é interrompido e os processos metabólicos cessados e se mantém durante sua cadeia de produção e consumo. Ela pode ser induzida por vários fatores que dizem respeito à estrutura lipídica e ambiente, como: grau de insaturação dos ácidos graxos, exposição à luz e calor, presença de oxigênio molecular e substâncias pró e antioxidantes. Ainda, substâncias encontradas naturalmente no tecido animal como ferro não heme, ferro heme (pigmentos) e peróxido de hidrogênio e alguns fatores externos como radiação e luz podem atuar como catalisadores ou promover a formação de espécies reativas ao oxigênio contribuindo para o desenvolvimento da oxidação lipídica. Sendo assim os lipídeos presentes na membrana celular e tecido adiposo podem sofrer oxidação através de três mecanismos diferentes: foto-oxidação, oxidação enzimática e auto-oxidação (AMARAL; SOLVA; LANNES, 2018; FAUSTMAN et al., 2010).

A foto-oxidação é estimulada pela energia de radiação, principalmente ultravioleta, na presença de sensibilizadores como a mioglobina e resulta na formação de hidroperóxidos diferentes dos formados na ausência de luz. A auto-oxidação depende da ação catalítica da temperatura, pH, íons metálicos e radicais livres e envolve três etapas: consumo dos substratos

ácidos graxos e oxigênio; formação dos produtos primários da oxidação peróxidos e hidroperóxidos; e formação de produtos secundários da oxidação como aldeídos, álcoois, hidrocarbonetos, e outros compostos voláteis e não-voláteis. A oxidação enzimática é catalisada pela enzima lipoxigenase que adiciona um oxigênio à cadeia de hidrocarboneto do ácido graxo e formação de peróxidos e hidroperóxidos que podem sofrer diferentes reações degenerativas (AMARAL; SOLVA; LANNES, 2018; FAUSTMAN et al., 2010).

A natureza e proporções relativas dos compostos formados durante a oxidação lipídica dependem da composição lipídica do animal, do método de processamento, condições de armazenamento e presença e concentração de substâncias pró e antioxidantes (AMARAL; SOLVA; LANNES, 2018).

Os lipídeos presentes na carne podem influenciar suas características de sabor e contribuem para sua maciez e suculência. Porém, como visto, a oxidação lipídica também é responsável pela deterioração da qualidade desse alimento, com redução de seu prazo de validade e interferência na cor, textura, valor nutricional, sabor e aroma, levando ao ranço e consequente rejeição do consumidor. Sendo assim, o controle ou minimização do processo de oxidação lipídica das carnes é de grande interesse da indústria de alimentos (AMARAL; SOLVA; LANNES, 2018).

2.8 Produção de filmes por *casting*

Filmes biodegradáveis podem ser produzidos pelo método de casting ou extrusão. O método casting, também chamado de processo úmido, é utilizado em pesquisas e consiste na solubilização da base polimérica do filme em solução aquosa que depois espalhada pela forma de moldagem para evaporação do solvente e formação do filme. Pelo método de extrusão ou processo seco são levados em consideração as propriedades termoplásticas que algumas proteínas e polissacarídeos apresentam em baixos níveis de umidade, sendo a moldagem dos filmes realizada pelos processos de extrusão e compressão desses materiais. A escolha da base polimérica é importante para a obtenção de filmes facilmente removíveis de suas superfícies de secagem sem apresentar enrugamento ou rasgamento do material (HERNANDEZ-IZQUIERDO; KROCHTA, 2008; THARANATHAN, 2003).

A técnica de *casting* é um processo bastante difundido na preparação de filmes. O biopolímero e demais ingredientes utilizados devem possuir a capacidade de formar uma matriz coesa e contínua e de fácil remoção do suporte utilizado para a secagem do solvente. Para filmes de IPS produzidos por casting, a desnaturação das proteínas do soro de leite é essencial para a produção dos filmes. Geralmente ela é alcançada pela utilização de calor em soluções aquosas

que envolvem principalmente a quebra de ligações dissulfeto. Consequentemente, novas ligações dissulfeto intermoleculares e as interações de Van der Waal são criadas com o plastificante e/ou partículas de reforço (ZUBAIR; ULLAH, 2020).

3 CONSIDERAÇÕES GERAIS

O desenvolvimento de biopolímeros proporciona à indústria de alimentos uma alternativa para reduzir o volume de plástico sintético descartado no meio ambiente contribuindo para o desenvolvimento sustentável do planeta. O estudo do comportamento desses polímeros biodegradáveis antioxidantes é importante por possibilitar o entendimento e desenvolvimento de novos materiais que possuam propriedades de desempenho melhores que seus biopolímeros puros, além de poder contribuir para a melhora da vida útil do alimento acondicionado.

4 CONCLUSÃO GERAL

A utilização de método físico (ultrassom) foi eficaz na produção de MPL, com redução do tamanho da partícula inicial e melhoria de suas propriedades físicas e antioxidantes, se tornando um material promissor para a utilização em biopolímeros. Quando aplicada aos filmes de IPS, as concentrações de 0,25 e 0,50% (p/p) foram capazes de formar filmes com melhores propriedades de desempenho e antioxidantes, e quando aplicados em carne moída mantida sob refrigeração, os filmes ativos foram eficazes na manutenção de sua vida útil. Pelo trabalho, sugere-se que a adiação de 0,50% (p/p) de MPL seja a concentração ideal para sua atuação como material de reforço e antioxidante em filmes de IPS produzidos por *casting*.

REFERÊNCIAS

AMERICAN SOCIETY STANDARD TESTING AND MATERIALS – **ASTM**. Methods of Identification and Quantitative Analysis of Synthetic Elastomers (Withdrawn 1959). ASTM D833-46. Philadelphia, 1955.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DO PLÁSTICO. **Perfil 2018:** Indústria brasileira de transformação e reciclagem de material plástico. Disponível em: <http://www.abiplast.org.br/wp-content/uploads/2019/10/perfil2018-web_VC.pdf> Acesso em: 02 mar. de 2020.

AMARAL, Ana Beatriz; SOLVA, Marcondes Viana Da; LANNES, Suzana Caetano Da Silva. Lipid oxidation in meat: Mechanisms and protective factors - a review. **Food Science and Technology**, [S. l.], v. 38, p. 1–15, 2018.

ANDERSON, G. Harvey; MOORE, Shannon E. The Emerging Role of Dairy Proteins and Bioactive Peptides in Nutrition and Health Dietary Proteins in the Regulation of Food Intake and Body Weight in Humans. **Journal of Nutrition**, [S. l.], v. 134, n. 4, p. 974–979, 2004.

ANDREO, Denise; JORGE, Neuza. Antioxidantes Naturais: Técnicas De Extração. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, [S. l.], v. 24, n. 2, p. 319–336, 2007. Disponível em: http://ojs.c3sl.ufpr.br/ojs/index.php/alimentos/article/view/7489

ATTARAN, Seyed Ahmad; HASSAN, Azman; WAHIT, Mat Uzir. Materials for food packaging applications based on bio-based polymer nanocomposites. **Journal of Thermoplastic Composite Materials**, [S. l.], v. 30, n. 2, p. 143–173, 2017.

AZEREDO, Henriette M. C. de. Nanocomposites for food packaging applications. **Food Research International**, [S. l.], v. 42, n. 9, p. 1240–1253, 2009. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2009.03.019

AZEVEDO, Viviane M. et al. Development of whey protein isolate bio-nanocomposites: Effect of montmorillonite and citric acid on structural, thermal, morphological and mechanical properties. **Food Hydrocolloids**, [S. l.], v. 48, p. 179–188, 2015 a.

AZEVEDO, Viviane Machado et al. Whey protein isolate biodegradable films: Influence of the citric acid and montmorillonite clay nanoparticles on the physical properties. **Food Hydrocolloids**, [S. l.], v. 43, p. 252–258, 2015 b.

AZEVEDO, Viviane Machado et al. Thermoplastic starch/whey protein isolate/rosemary essential oil nanocomposites obtained by extrusion process: Antioxidant polymers. **Journal of Applied Polymer Science**, [S. l.], v. 136, n. 23, p. 1–12, 2019.

BEISL, Stefan; FRIEDL, Anton; MILTNER, Angela. Lignin from micro- To nanosize: Applications. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 18, n. 11, 2017.

BEISL, Stefan; MILTNER, Angela; FRIEDL, Anton. Lignin from micro- to nanosize: **Production methods**. [S. l.: s. n.]. v. 18.

BENBETTAÏEB, Nasreddine; DEBEAUFORT, Frédéric; KARBOWIAK, Thomas. Bioactive edible films for food applications: mechanisms of antimicrobial and antioxidant activity. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, [S. l.], v. 59, n. 21, p. 3431–3455, 2019. Disponível em: https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1494132

CARVALHO, Raissa Alvarenga et al. Bio-nanocomposites for food packaging applications: effect of cellulose nanofibers on morphological, mechanical, optical and barrier properties. **Polymer International**, [S. l.], v. 67, n. 4, p. 386–392, 2018.

CARVALHO, Raissa Alvarenga et al. Biopolymers of WPI/CNF/TEO in preventing oxidation of ground meat. **Journal of Food Processing and Preservation**, [S. l.], n. September, p. 1–10, 2019.

CHLOE, E.; MIN, D. B. Mechanisms and factors for edible oil oxidation. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, Chicago, v. 5, n. 4, p. 169-186, Sept. 2006

CORAL MEDINA, Jesus David et al. Biological activities and thermal behavior of lignin from oil palm empty fruit bunches as potential source of chemicals of added value. **Industrial Crops and Products**, [S. l.], v. 94, p. 630–637, 2016. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.09.046

CROUVISIER-URION, Kevin et al. Biobased Composite Films from Chitosan and Lignin: Antioxidant Activity Related to Structure and Moisture. **ACS Sustainable Chemistry and Engineering**, [S. l.], v. 4, n. 12, p. 6371–6381, 2016.

DAINELLI, Dario et al. Active and intelligent food packaging: legal aspects and safety concerns. **Trends in Food Science and Technology**, [S. l.], v. 19, n. SUPPL. 1, 2008. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2008.09.011

DE OLIVEIRA, Maíra Maciel Mattos et al. Condições higiênico-sanitárias de máquinas de moer carne, mãos de manipuladores e qualidade microbiológica da carne moída. **Ciencia e Agrotecnologia**, [S. l.], v. 32, n. 6, p. 1893–1898, 2008.

DE SOUZA, Renata Silva Cabral et al. Evaluation of the antioxidant potential of whey protein concentrated by ultrafiltration and hydrolyzed by different commercial proteases. **Brazilian Journal of Food Technology**, [S. l.], v. 22, n. Atcc 13076, p. 1–11, 2019.

DIAS, Marali Vilela et al. Development of chitosan/montmorillonite nanocomposites with encapsulated α-tocopherol. **Food Chemistry**, [S. l.], v. 165, p. 323–329, 2014. Disponível em: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S030881461400836X

DOMENEK, Sandra et al. Potential of Lignins as Antioxidant Additive in Active Biodegradable Packaging Materials. **Journal of Polymers and the Environment**, [S. l.], v. 21, n. 3, p. 692–701, 2013.

DOPPALAPUDI, Sindhu et al. Biodegradable polymers-an overview. **Polymers for Advanced Technologies**, [S. l.], v. 25, n. 5, p. 427–435, 2014. Disponível em: http://doi.wiley.com/10.1002/pat.3305

DUNCAN, Timothy V. Applications of nanotechnology in food packaging and food safety: Barrier materials, antimicrobials and sensors. **Journal of Colloid and Interface Science**, [S. l.], v. 363, n. 1, p. 1–24, 2011. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.jcis.2011.07.017

EL-NEMR, Khaled F. et al. Polyvinyl alcohol/gelatin irradiated blends filled by lignin as green filler for antimicrobial packaging materials. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, [S. l.], v. 00, n. 00, p. 1–25, 2019. Disponível em: https://doi.org/10.1080/03067319.2019.1657108

FAROOQ, Muhammad et al. Strong, Ductile, and Waterproof Cellulose Nanofibril Composite Films with Colloidal Lignin Particles. **Biomacromolecules**, [S. l.], v. 20, n. 2, p. 693–704, 2019.

FAUSTMAN, Cameron et al. Myoglobin and lipid oxidation interactions: Mechanistic bases and control. **Meat Science**, [S. l.], v. 86, n. 1, p. 86–94, 2010. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2010.04.025

FORTUNATI, E. et al. Lignocellulosic nanostructures as reinforcement in extruded and solvent casted polymeric nanocomposites: an overview. **European Polymer Journal**, [S. l.], v. 80, p. 295–316, 2016. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2016.04.013

FRANGVILLE, Camille et al. Fabrication of environmentally biodegradable lignin nanoparticles. **ChemPhysChem**, [S. l.], v. 13, n. 18, p. 4235–4243, 2012.

GILCA, Iulian Andrei; POPA, Valentin I.; CRESTINI, Claudia. Obtaining lignin nanoparticles by sonication. **Ultrasonics Sonochemistry**, [S. l.], v. 23, p. 369–375, 2015. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.ultsonch.2014.08.021

GÓMEZ-ESTACA, Joaquín et al. Advances in antioxidant active food packaging. **Trends in Food Science and Technology**, [S. l.], v. 35, n. 1, p. 42–51, 2014.

GONG, Weihua et al. Composition and structure of an antioxidant acetic acid lignin isolated from shoot shell of bamboo (Dendrocalamus Latiforus). **Industrial Crops and Products**, [S. l.], v. 91, p. 340–349, 2016. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.07.023

HE, Xiaoyan et al. Thermal, antioxidant and swelling behaviour of transparent polyvinyl (alcohol) films in presence of hydrophobic citric acid-modified lignin nanoparticles. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 127, p. 665–676, 2019. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.01.202

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

JIANG, C. et al. Nano-lignin filled natural rubber composites: Preparation and characterization. **Express Polymer Letters**, [S. l.], v. 7, n. 5, p. 480–493, 2013.

KAUR, Charanjit; KAPOOR, Harish C. Antioxidants in fruits and vegetables - The millennium's health. **International Journal of Food Science and Technology**, [S. l.], v. 36, n. 7, p. 703–725, 2001.

KOKOSZKA, Sabina et al. Water vapour permeability, thermal and wetting properties of whey protein isolate based edible films. **International Dairy Journal**, [S. l.], v. 20, n. 1, p. 53–60, 2010. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2009.07.008

KOVALCIK, Adriana et al. Designing packaging materials with viscoelastic and gas barrier properties by optimized processing of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) with lignin. **Reactive and Functional Polymers**, [S. l.], v. 94, p. 25–34, 2015. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2015.07.001

LE DIGABEL, F.; AVÉROUS, L. Effects of lignin content on the properties of lignocellulose-based biocomposites. **Carbohydrate Polymers**, [S. l.], v. 66, n. 4, p. 537–545, 2006.

MIRANDA, Cleidiene S. et al. Starch-based Films Plasticized with Glycerol and Lignin from Piassava Fiber Reinforced with Nanocrystals from Eucalyptus. **Materials Today: Proceedings**, [S. l.], v. 2, n. 1, p. 134–140, 2015. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.matpr.2015.04.038

MOHANTY, D. P. et al. Milk derived bioactive peptides and their impact on human health – A review. **Saudi Journal of Biological Sciences**, [S. l.], v. 23, n. 5, p. 577–583, 2016. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.sjbs.2015.06.005

NAIK, Prashantha; ROZMAN, Hj Din; BHAT, Rajeev. Genoprotective effects of lignin isolated from oil palm black liquor waste. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, [S. l.], v. 36, n. 1, p. 135–141, 2013. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.etap.2013.03.004

NASEEM, Amina et al. Lignin-derivatives based polymers, blends and composites: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 93, p. 296–313, 2016. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.08.030

NÚÑEZ-FLORES, R. et al. Physical and functional characterization of active fish gelatin films incorporated with lignin. **Food Hydrocolloids**, [S. l.], v. 30, n. 1, p. 163–172, 2013. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.05.017

OJAGH, S. M. et al. Lessening of high-pressure-induced changes in Atlantic salmon muscle by the combined use of a fish gelatin-lignin film. **Food Chemistry**, [S. l.], v. 125, n. 2, p. 595–606, 2011. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.08.072

OLIVEIRA, Eloísa De et al. Ligninas – Métodos de obtenção e caracterização química lignins – **isolation methods and chemical characterization**. [S. l.], p. 917–928, 2001.

OSÉS, Javier et al. Development and characterization of composite edible films based on whey protein isolate and mesquite gum. **Journal of Food Engineering**, [S. l.], v. 92, n. 1, p. 56–62, 2009. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2008.10.029

PAN, Xuejun et al. Organosolv ethanol lignin from hybrid poplar as a radical scavenger: Relationship between lignin structure, extraction conditions, and antioxidant activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [S. l.], v. 54, n. 16, p. 5806–5813, 2006.

PEREIRA DE ABREU, D. a.; CRUZ, J. M.; PASEIRO LOSADA, P. Active and Intelligent Packaging for the Food Industry. **Food Reviews International**, [S. l.], v. 28, n. 2, p. 146–187, 2012.

RAMEZANI, Nasim; SAIN, Mohini. Thermal and Physiochemical Characterization of Lignin Extracted from Wheat Straw by Organosolv Process. **Journal of Polymers and the Environment**, [S. l.], v. 26, n. 7, p. 3109–3116, 2018. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1007/s10924-018-1199-2

RAMOS, ??scar L. et al. Effect of whey protein purity and glycerol content upon physical properties of edible films manufactured therefrom. **Food Hydrocolloids**, [S. l.], v. 30, n. 1, p. 110–122, 2013. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.05.001

RHIM, Jong Whan; NG, Perry K. W. Natural biopolymer-based nanocomposite films for packaging applications. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, [S. l.], v. 47, n. 4, p. 411–433, 2007.

RHIM, Jong Whan; PARK, Hwan Man; HA, Chang Sik. Bio-nanocomposites for food packaging applications. **Progress in Polymer Science**, [S. l.], v. 38, n. 10–11, p. 1629–1652, 2013. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2013.05.008

SALANTI, Anika et al. Structural characterization and antioxidant activity evaluation of lignins from rice husk. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [S. l.], v. 58, n. 18, p. 10049–10055, 2010.

SAMAL, Sangram K. et al. Bio-based Polyethylene-Lignin Composites Containing a Pro-oxidant/Pro-degradant Additive: Preparation and Characterization. **Journal of Polymers and the Environment**, [S. l.], v. 22, n. 1, p. 58–68, 2014.

SATHAWONG, Sidthipong; SRIDACH, Waranyou; TECHATO, Kua anan. Recovery of Kraft Lignin from OPEFB and Using for Lignin–Agarose Hydrogel. **Journal of Polymers and the Environment**, [S. l.], v. 26, n. 8, p. 3307–3315, 2018. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1007/s10924-018-1218-3

SEYDIM, A. C.; SARIKUS, G. Antimicrobial activity of whey protein based edible films incorporated with oregano, rosemary and garlic essential oils. **Food Research International**, [S. l.], v. 39, n. 5, p. 639–644, 2006.

SHAHIDI, Fereidoon; JANITHA, P. K.; WANASUNDARA, P. D. Phenolic Antioxidants. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, [S. l.], v. 32, n. 1, p. 67–103, 1992.

SHANKAR, Shiv; REDDY, Jeevan Prasad; RHIM, Jong Whan. Effect of lignin on water vapor barrier, mechanical, and structural properties of agar/lignin composite films. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 81, p. 267–273, 2015. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.08.015

SHOGREN, Randal et al. Plant-based materials and transitioning to a circular economy. **Sustainable Production and Consumption**, [S. l.], v. 19, p. 194–215, 2019. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.spc.2019.04.007

SILVESTRE, Clara; DURACCIO, Donatella; CIMMINO, Sossio. Food packaging based on polymer nanomaterials. **Progress in Polymer Science** (Oxford), [S. l.], v. 36, n. 12, p. 1766–1782, 2011. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.02.003

SIPPONEN, Mika Henrikki et al. Lignin for nano- and microscaled carrier systems: applications, trends and challenges. **ChemSusChem**, [S. l.], p. cssc.201900480, 2019. Disponível em: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/cssc.201900480

SMITHERS, Geoffrey W. Whey and whey proteins-From "gutter-to-gold". **International Dairy Journal**, [S. l.], v. 18, n. 7, p. 695–704, 2008.

SOTHORNVIT, Rungsinee 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**, [S. l.], v. 43, n. 2, p. 279–284, 2010. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2009.08.010

SPIRIDON, Iuliana et al. Biological and Pharmaceutical Applications of Lignin and Its Derivatives : a Mini-Review. **Cellulose chemistry and technology**, [S. l.], v. 52, p. 543–550, 2018.

TANG, X. Z. et al. Recent Advances in Biopolymers and Biopolymer-Based Nanocomposites for Food Packaging Materials. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, [S. l.], v. 52, n. 5, p. 426–442, 2012.

THAKUR, Sourbh et al. Sustainability of bioplastics: Opportunities and challenges. **Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry**, [S. l.], v. 13, p. 68–75, 2018. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2018.04.013

THARANATHAN, R. N. Biodegradable films and composite coatings: Past, present and future. **Trends in Food Science and Technology**, [S. l.], v. 14, n. 3, p. 71–78, 2003.

TORNUK, Fatih et al. LLDPE based food packaging incorporated with nanoclays grafted with bioactive compounds to extend shelf life of some meat products. **LWT - Food Science and Technology**, [S. l.], v. 64, n. 2, p. 540–546, 2015. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2015.06.030

UL, A. R : Concise Reviews / Hypotheses in Food Science Intelligent Packaging : t **package devices**. [S. l.], v. 70, n. 1, p. 1–10, 2005.

VANHOLME, Ruben et al. Lignin Biosynthesis and Structure 1. [S. l.], v. 153, n. July, p. 895–905, 2010.

WATKINS, Dereca et al. Extraction and characterization of lignin from different biomass resources. **Journal of Materials Research and Technology**, [S. l.], v. 4, n. 1, p. 26–32, 2015. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.jmrt.2014.10.009

XING, Qianqiu et al. Biodegradable UV-Blocking Films through Core-Shell Lignin-Melanin Nanoparticles in Poly(butylene adipate- co-terephthalate). research-article. **ACS Sustainable Chemistry and Engineering**, [S. l.], v. 7, n. 4, p. 4147–4157, 2019.

YANG, W. et al. Synergic effect of cellulose and lignin nanostructures in PLA based systems for food antibacterial packaging. **European Polymer Journal**, [S. l.], v. 79, p. 1–12, 2016 a. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2016.04.003

YANG, W. et al. Antioxidant and antibacterial lignin nanoparticles in polyvinyl alcohol/chitosan films for active packaging. **Industrial Crops and Products**, [S. l.], v. 94, n. January, p. 800–811, 2016 b. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.09.061

YILDIRIM, Selçuk et al. Active Packaging Applications for Food. Comprehensive Reviews in **Food Science and Food Safety**, [S. l.], v. 17, n. 1, p. 165–199, 2018.

ZACARCHENCO, P. B. et al. Tecnologias para a industrialização do soro de leite (in portuguese). **XII Congresso Internacional do Leite**, [S. l.], p. 2–4, 2013.

ZHOU, G. H.; XU, X. L.; LIU, Y. Preservation technologies for fresh meat - A review. **Meat Science**, [S. l.], v. 86, n. 1, p. 119–128, 2010.

ZINOVIADOU, Kyriaki G.; KOUTSOUMANIS, Konstantinos P.; BILIADERIS, Costas G. Physical and thermo-mechanical properties of whey protein isolate films containing antimicrobials, and their effect against spoilage flora of fresh beef. **Food Hydrocolloids**, [S. l.], v. 24, n. 1, p. 49–59, 2010. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2009.08.003

ZOLFI, Mohsen et al. The improvement of characteristics of biodegradable films made from kefiran-whey protein by nanoparticle incorporation. **Carbohydrate Polymers**, [S. l.], v. 109, p. 118–125, 2014.

ZUBAIR, Muhammad; ULLAH, Aman. Recent advances in protein derived bionanocomposites for food packaging applications. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, [S. l.], v. 60, n. 3, p. 406–434, 2020. Disponível em: https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1534800

SEGUNDA PARTE – ARTIGOS

ARTIGO 1

DEVELOPMENT AND CHARACTERIZATION OF LIGNIN MICROPARTICLES FOR PHYSICAL AND ANTIOXIDANT ENHANCEMENT OF BIODEGRADABLE POLYMERS

Aceito para publicação em 15 de fevereiro de 2020
Periodico: Journal of Polymers and the Environment (JCR: 2,765)
DOI: 10.1007/s10924-020-01685-z.

DEVELOPMENT AND CHARACTERIZATION OF LIGNIN MICROPARTICLES FOR PHYSICAL AND ANTIOXIDANT ENHANCEMENT OF BIODEGRADABLE POLYMERS

Raissa Alvarenga Carvalho Gomide [a], Ana Carolina Salgado de Oliveira[*a], Danielle Aparecida Caetano Rodrigues [a], Cassiano Rodrigues de Oliveira [b], Odílio Benedito Garrido de Assis [c], Marali Vilela Dias [a], Soraia Vilela Borges [a]

[a] Food Science Department, Federal University of Lavras, 37200-900, Lavras, MG, Brazil.

[b] Institute of Exact and Technological Sciences, Federal University of Viçosa, 38810-000, Rio Paranaíba, MG, Brazil.

[c] Embrapa Instrumentação, 13560-970, São Carlos, SP, Brazil.

* Correspondent: ancarolengalimentos@gmail.com Tel.: +55 35 98463-1700

Abstract: As the largest aromatic polymer of natural origin, lignin arouses the interest of researchers and industries worldwide. Its three-dimensional polymeric aromatic structure, besides being complex, varies depending on its botanical origin and extraction process, which makes its use as a raw material difficult. Currently, the main destination for lignin is burning for energy production. This study presents the characterization of lignin and lignin microparticles after processing by ultrasonic irradiation. Analyzes were performed to verify the dimensional, morphological and antioxidant characteristics of the particles as well as changes in their structure after sonication. A sample of eucalyptus wood lignin isolated from kraft black liquor was used and the modifications were analyzed by X-ray diffraction analysis, zeta potential, FTIR spectroscopy, particle size, scanning electron microscopy, TGA thermogravimetric analysis, phenolic compounds total by Folin-Ciocalteau and antioxidant analysis by DPPH. The results demonstrate that there was no change in the chemical structure of lignin with the application of ultrasonic radiation, but the reduction in particle size was able to reduce zeta potential with a lower probability of agglomeration between them, and consequent greater stabilization in solution. Also, the ultrasound treatment was able to increase the thermal stability of the lignin microparticle with a decrease of the mass loss rate with the time. The reduction in particle size was also able to expose a larger number of phenolic compounds and thereby increase the total phenolic content and lignin antioxidant activity making the lignin microparticle a promising material to study and application on food-active biodegradable polymers.

Keywords: microlignin; packaging; ultrasound; microscopy; thermal behavior.

1. Introduction

Lignin, after cellulose, is the second most abundant component of wood, thus it is widely found in nature and is produced at a rate of 70 million tons per annum. It is a natural polymer compound with a phenylpropane structure. The abundance and potential for use in various sectors, such as fuels, biocides, chemicals, additives for paper and concrete, dispersants, cosmetics, paints, among others, have led to an increase in the academic research and industry interests [1-8].

The primary precursors for lignin synthesis are hydroxycinnamic alcohols (monolignols), including coniferyl alcohol and synaphyl alcohol, with small amounts of ρ-coumaryl alcohol, joined by aromatic and aliphatic bonds and also by non-aromatic C-C bonds. Lignin exhibits a complex structure, containing cross-linked phenolic polymers and numerous functional groups such as aliphatic and phenolic hydroxyls and methoxy groups [9,7,10]. These functional groups affect the chemical and reactivity properties of lignin, thus determining its characteristics. Moreover, it is characterized as a highly branched amorphous phenolic compound, and its structure is considerably variable depending on the botanical origin, harvest period, and extraction process [11].

Recently, lignin micro- and nanoparticles have gained interest from researchers due to the improvement of their properties when compared to those of standard lignin, with several studies reported in the literature such as entrapping and encapsulation of pesticides, drugs, enzymes, sunscreen, surfactant, mechanical reinforcement material, and antioxidant activity of polymers [12,13].

The use of biodegradable materials for film and packaging production has also been extensively studied, mainly aiming at reducing the environmental impact caused by the improper disposal of plastic packaging and as an alternative to the use of petroleum, a non-renewable source [14,15]. Thus, the use of lignin at a micro or nanoscale may be an interesting alternative, once it has a biodegradable structure, and can be obtained as a co-product of the cellulose industry. When used in the production of films, these structures have a positive effect on the increase in UV barrier, besides the mechanical, thermal, antimicrobial, and antioxidant properties and the biocide effect in packaging materials [16-18].

Several methods of production of lignin micro- and nanoparticles have been reported in the literature, such as solvent or pH shifting, polymerization, ice-segregation, aerosol processing, mechanical processing, among others [1]. Mechanical processing is a simple method of producing lignin microparticles (LMP) and can be done using ultrasound. During the process, the occurrence of breakages and chemical reactions in the lignin structure is strongly related to the cavitation phenomenon, and in the case of polymers, ultrasound leads to the formation of homolytic breakage of chains, yielding a pair of radicals or polymerization with the formation of lignin monomers [19].

Therefore, this study aims to produce and characterize lignin microparticles (LMP) for later application as a biopolymer enhancement material. The LMP were produced by mechanical modification with ultrasound using the kraft black liquor technique. Then, the LMP were characterized for X-ray diffraction, zeta potential, Fourier transform infrared (FTIR) spetroscopy, particle size,

scanning electron microscopy (SEM), thermogravimetric analysis (TGA), determination of phenolic compounds by Folin-Ciocalteau reagent, and the antioxidant potential by the DPPH free radical sequestration method.

2. Material and methods

2.1. Materials

Lignin isolated from black kraft liquor was kindly donated by the Laboratory of Bioactive Products and Technological Solutions at Federal University of Viçosa (Rio Paranaíba Campus).

2.2. Synthesis of lignin microparticles

An aqueous suspension of lignin (0.7%, w/v) was used. The suspension was sonicated for 60 min, resulting in a stable microdispersion, which was dried under mild conditions (60 ° C /24h) before characterization. A sonicator (Sonifier Cell Disruptor Branson model 450D, Manchester, UK) was used at a frequency of 20KHz and 400W [19].

2.3. Characterization of the particles

2.3.1. X-Ray Powder Diffraction (XRD)

The X-ray powder diffraction was performed in an XRD-6000 (Shimadzu) diffractometer with Cu-kαl filter radiation (λ = 1.5406Å), operating at 30kV and 30mA. The samples were fixed in aluminum support and analyzed at a scanning rate of 4º / min, with 2θ ranging from 5 to 70º at room temperature. The curves were analyzed using the software Origin® 9.0.

2.3.2. Zeta potential

Zeta potential is a measure of the electrical charge of the material, from the interaction between a suspended colloidal solid material and a given liquid, using a Zetasizer Analyzer (Nano ZS ZEN 36000 - Malvern Instruments). The results of zeta potential were expressed in mV, and an average of 5 readings was performed for data analysis.

2.3.3. FTIR analysis

Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy was performed using an FTS 3000 Excalibur Digilab (United States) spectrometer equipped with ATR detector, 4000 – 400 cm^{-1} spectral range, 64 scans, and 4 cm^{-1} resolution.

2.3.4. Particle size

The particle size distribution of the samples was performed using the Zetasizer Analyzer (Nano ZS ZEN 36000 - Malvern Instruments). The equipment allows the determination of the particle size of the samples by the dynamic light scattering technique.

2.3.5. Scanning Electron Microscopy

The samples were mounted on aluminum stubs using double-coated carbon, gold-coated (SCD 050) and observed on the Scanning Electron Microscope (LEO Evo 40) in the Electron Microscopy and Ultrastructural Analysis Laboratory.

2.3.6. Thermogravimetric analysis

The thermal stability and degradation profile of the samples were determined by thermogravimetric analysis (TGA) in DTG60H-SHIMADZU apparatus (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan). The analysis was performed under a nitrogen atmosphere with a flow rate of 50mL/min, heating from 25 to 800 °C, at a ratio of 10 °C/min, using 5 mg of sample.

2.3.7. Antioxidant behavior

The antioxidant behavior of samples was evaluated according to the methodology described in previous work [20]. The total phenolics compounds (TPC) was determined spectrophotometrically by the Folin-Ciocalteau method. Briefly, a 0.2 mL aliquot of the extract was thoroughly mixed with 0.8 mL of 0.2 N Folin–Ciocalteu reagent and allowed to stand for 20 min in the dark. Then, 1 mL of 8.5% (w/v) sodium carbonate was added to the mixture and mixed gently. After a 30-min incubation, the mixture was centrifuged at 12,000 rpm for 10 min. The supernatant was measured spectrophotometrically at 760 nm. A standard gallic acid solution was used for the construction of a calibration curve. TPC was calculated from the calibration curve, and the results were expressed as mg gallic acid equivalents (GAE)/g.

The radical scavenging activity (RSA) of lignin, lignin microparticles (MPL), and butylated hydroxytoluene (BHT synthetic antioxidant used as a reference) were determined by spectroscopy at 517 nm, measuring the reduction of the free radical 2,2-diphenyl- 1-picrylhydrazyl (DPPH) (Sigma-

Aldrich) by the antioxidant compound. The assay was performed by adding lignin aqueous solution in 2 mL DPPH solution in methanol (25 mg/L) to give a final lignin concentration of 30, 50, and 100 mg/L. After 30 minutes of reaction, the absorption was measured at 517 nm using a Bel SPECTRO S-2000 spectrophotometer (Monza, Italy). The antioxidant activity of the samples was expressed as follows:

(RSA%) = (Acontrol – Asample / Acontrol) x 100

where Acontrol corresponds to the absorbance values of the control (methanol) at time zero and Asample corresponds to the absorbance values of the samples at different reading times.

2.4. Statistical analysis

The total phenolics compounds and antioxidant activity by DPPH were analysed using Statistica software (ver. 8, Stat Soft Inc., Tulsa, USA). The analysis of variance test was used and the treatment means were compared by Tukey test.

3. Results and discussion

3.1. X-Ray Powder Diffraction (XRD)

X-ray powder diffraction analysis was performed to study the morphology of lignin and LMP in more detail. For both the lignin and LMP samples, the diffractograms showed a wide area under the curve, which confirms the amorphous characteristic of both samples (Figure 1). The maximum 2θ values were 20.26 and 22.94 for lignin and LMP, respectively.

The mean size of the ordered domain influences the process of incorporation of controlled-release agents to lignin. In order to identify ordered domains, peak fitting was performed by Gaussian, Loretzian, Pearson VII and Pseudo-Vigot models. The best model fitting for lignin and LMP was Pseudo-Vigot at both diffractograms. Goudarzi et al. [21] found an average peak for hardwood located at 21.2 ± 0.15° while Kubo, Kadla [22] reported the acid lignin from hardwood average peak at 22.7º. Differences in chemical structures of lignins, method of isolation and type of sources may explain the variation observed above. The mean size of the ordered domains is usually estimated by Scherrer's equation: $d = B\lambda/\beta\cos\theta$, where d is the mean size of the ordered domains, B = dimensionless shape factor (value of 0.9 is used), λ = X-ray wavelength (0.154nm for Cu Kα), and β = full width at half maximum (FWHM) [21]. Table 1 shows the results of the calculated mean size of the ordered domains ("d" in Scherrer's equation) for lignin and LMP.

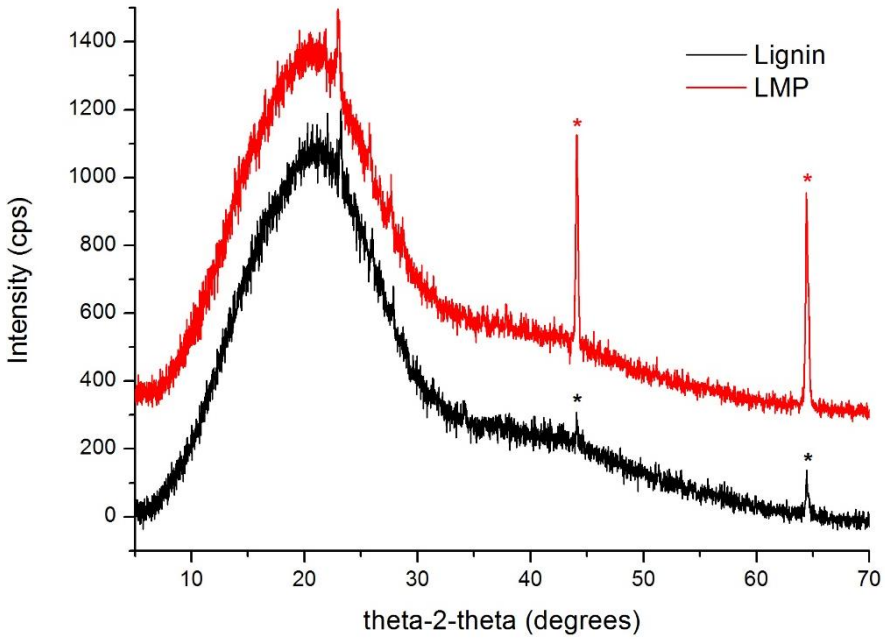


Figure 1. XRD patterns of lignin and lignin microparticle (LMP)
* Peaks corresponding to the aluminum sample holder.

Table 1. Location of the maximum peak for lignin and LMP in XRD patterns and mean size of the ordered domain from Gaussian method.

Sample	Fitting method	2θ (º)	R^2	FWHM*	Mean size of the ordered domain (nm)
Lignin	Pseudo-Vigot	20.26	0.94798	14.21961	0.59nm
MPL	Pseudo-Vigot	22.94	0.93344	13.91517	0.60nm

*FWHM is obtained via Gaussian regression parameters set.

Lignin and LMP present almost the same values for the mean size ordered domains. This prove that amorphous behavior can be observed in both materials, being independent of sonication treatment. Thus, the reach of micrometers dimensions on lignin particles after sonication may not change the chemical composition, neither the spatial structure.

3.2. Zeta Potential

Zeta potential analysis of colloidal suspensions provides an overview of the stability and organization of particles in the medium, as it evaluates the repulsive or attractive electrostatic forces between the particles. For smaller sized materials, such as the lignin microparticles, the more negative the zeta potential value, the greater the electrostatic repulsion between particles and the greater the stability of the suspension, due to the little formation of aggregates when applied to nanocomposites.

The mean zeta potential values of lignin and lignin microparticles were 0.056 and -40.0 mV, respectively. The results found for lignin, close to zero, indicate no surface charge, and therefore a tendency for particle agglomeration on a larger scale. For the lignin microparticles, the negative values indicate a repulsion characteristic of the lignin microparticles, with a lower probability of agglomeration between them, and consequent greater stabilization [23].

The negative zeta potential value found for the LMP sample can be partially explained by the presence of negative phenol group charges and the possible adsorption of hydroxyl ions on the hydrophobic part of the microparticle. Moreover, the charges found may be associated with other functional groups such as carboxyls and sulfonic groups, in which oxygen atoms would be negatively charged [23].

Yang et al. [13] found zeta potential values ranging from -21.3 to -32.9 mV for nanolignin samples produced from acid hydrolysis. Mattinen et al. [24] found similar zeta potential values to this study when analyzing lignin nanoparticles treated or not with enzymes for crosslinking and consequent improvement of their application in biomaterials. The values found by them ranged from -29 to -47mV. They correlate the decrease in zeta potential values with the increase in lignin particle oxidation and the formation of new carboxylic acid groups. The authors also correlate the decrease in value with the increase of lignin nanoparticle stability in aqueous solution. Shulga et al. [25] also found zeta potential values ranging from -51 to -19 for lignin particles from two different plant sources and at different pH values (3.5, 5.8 and 11.0). According to the study, alkaline pH lignin particles showed the best results for oil-in-water emulsion stability (with the most negative zeta potential values) due to the presence of negatively charged ionic groups such as hydroxyls, carboxyls and phenolics on the surface of lignin.

3.3 FTIR analysis

The results of the FTIR analysis show the main lignin and lignin microparticle bonds in the range of 4000 - 400cm^{-1}, which is an important tool for the characterization of the structure of these samples. All spectra are shown in Figure 2.

In general, the abundance of peaks for both samples demonstrates the structural complexity of lignin and LMP, probably due to the variety of vibrational modes of chemical bonds present in the polymer structures. In addition, the similarity between the spectra indicates small chemical changes between the samples, confirming the XRD results.

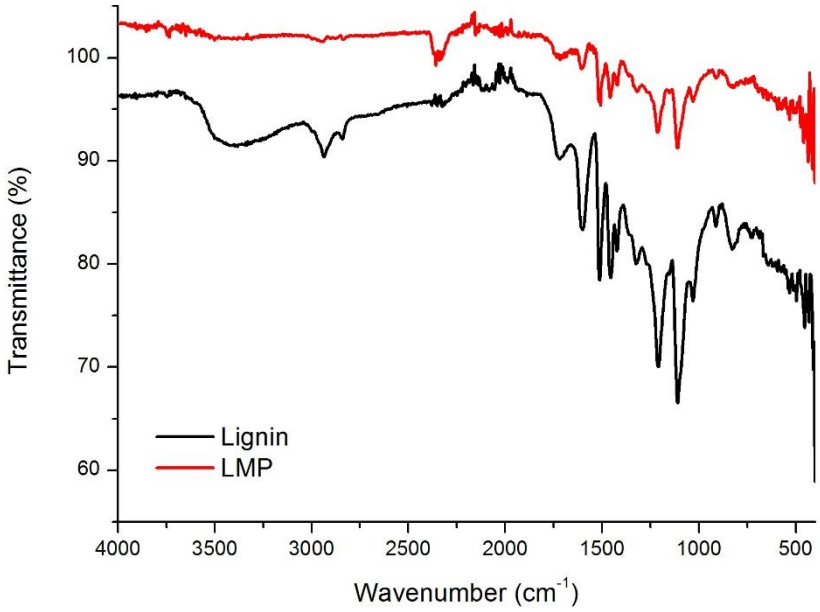


Figure 2. FTIR spectra of lignin and lignin microparticle (LMP)

For both samples, the peaks at 2900 cm^{-1} correspond to the vibration of the C-H bond in methyl groups (-CH3); the peaks at 1700-1660 cm^{-1} correspond to the C = O bond vibrations of carboxylic groups; the peaks at 1500-1600 cm^{-1} are characteristic of aromatic ring vibrations and C-H, O-H, C=O bonds; the peaks at 1460 cm^{-1} correspond to C-H bonds of methyl groups; the peaks at 1420cm^{-1} correspond to aromatic ring vibrations; the peaks at 1370cm^{-1} correspond to O-H bonds of phenolic and non-ether groups and syringyl units; the peaks at 1330cm^{-1} correspond to vibrations in guaiacil groups; the peaks at 1160-1130cm^{-1} refer to OH bonds of secondary alcohols; and finally the peaks at 1040cm^{-1} characterize OH bonds of primary alcohols. In addition, LMP showed an increase in the absorption band at 1120cm^{-1}, which is characteristic of condensed aromatic rings [21,26].

For the lignin spectrum, a shoulder length at 860cm^{-1}, characteristic of binding in arabinogalactan polysaccharides, was observed, which was not observed in LMP. A similar result was found by García et al. [27], who attributed the disappearance to the release of this type of hemicellulosic constituent from the main chain during sonication. The authors explain that the lateral hemicellulosic chains are the first to be affected after ultrasonic treatment, releasing mainly glucose and arabinose molecules from the lignin structure. The decrease in other bands intensity related to hemicellulosic constituent, i.e. xylose at 1030cm^{-1} and glycosidic bonding at 895cm^{-1}, were found to LMP sample being explained for the same reason.

When comparing both spectra, a decrease in peak intensity of MPL was observed when compared to lignin. This behavior may be due to the separation of hemicellulosic constituents from the lignin chain, leading to a decrease in peak intensity at 1160-1130cm^{-1} and 1040cm^{-1}. These groups correspond to the bonds between lignin units and monosaccharide units, as well as lignin-carbohydrate complexes, and the reduction of peak intensities is also related to the structural degradation of lignin

and the hemicellulosic constituents, indicating that there was both removal of hemicelluloses and breakdown of the lignin molecule.

In the region corresponding to the O-H stretching absorption of the hydroxyl groups, from 3000 cm^{-1} to 3700 cm^{-1}, higher peak intensity was observed for lignin when compared to LMP.

3.4. Particle size distribution

The results of particle size distribution showed the occurrence of a bimodal distribution with two mean peaks for the LMP at 605.5nm (63.3%) and 475.8nm (36.7%) while for lignin there was only an intense peak at 4,849.0 nm (100%). It can be seen that the methodology was effective for the reduction of the lignin particle size.

According to Gilca et al. [19], the development of broken bonds and chemical reactions during the ultrasonic process is strongly related to the cavitation phenomenon. Cavitation is induced by high ultrasonic frequencies (16KHz-100MHz) passing through the mass of the liquid. During the process, millions of air bubbles form in the liquid phase, at an adequate intensity allows the development of cavities. The collapse or inclusion of these cavities creates sites with high temperature and pressure in a short period, forming hot spots in the cold liquid. The transition state of these sites allows the first chemical reactions to occur during and after the microbubble collapse. In the presence of water and air, hydroxyl and superoxide radicals are formed. Furthermore, the radicals formed during the sonication process depend on the number of cavities and radicals formed per cavity. In the case of polymers, the ultrasonic process treatment can lead to the formation of homolytic breakage of macromolecular chains, yielding a pair of radicals or polymerization of monomers with a consequent decrease in size.

As explained in item 3.3, during the ultrasonic radiation process there is a removal of hemicellulosic impurities from the lignin structure. Hemicelluloses are usually composite of the main chain of xylose units from which come shorter branches formed by glucose, arabinose and xylose units and the release of these monosaccharides during sonication occurs exactly from these side chains, with the proportion between them varying according to botanical origin and lignin extraction methods. Also, during periods of sonication longer than 30 minutes, degradation or transformation of these released polysaccharides may occur. Studies also indicate that after the treatment of lignin with ultrasonic radiation, there is a tendency to decrease its molecular weight, with most of the resulting components becoming smaller monomers or hemicellulosic chains [28].

3.5. Scanning electron microscopy

The micrographs of dried lignin and lignin microparticles are shown in Figure 3 and confirm the results obtained by dynamic light scattering, i.e., a decrease in size after the ultrasonic treatment.

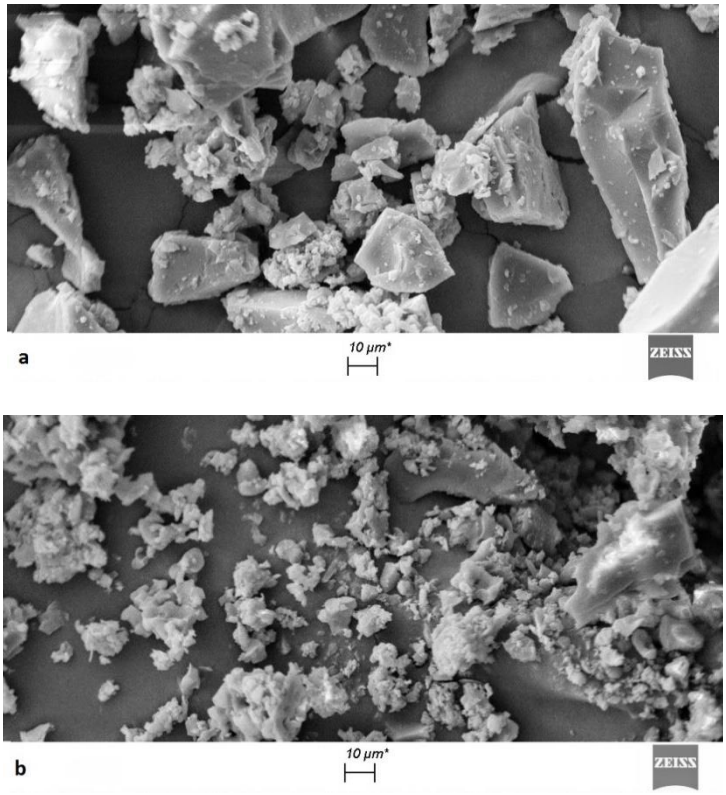


Figure 3 Micrographs obtained by scanning electron microscopy of lignin (a) and lignin microparticles LMP (b) at 1000x magnification.

The micrographs of lignin and LMP are in accordance with those reported in the literature. Meng et al. [29] found similar images for *kraft* lignin and characterized the sample by an irregular morphology. Lu et al. [11] found similar micrographs for lignin and relate the reduction of particle size with the increase in antioxidant activity related to the bigger surface contact area in the samples.

3.6. Thermogravimetric analysis (TGA)

Different methods and temperatures can be used in the production of biodegradable polymers. Therefore, the study of the thermal properties of lignin and lignin microparticle was needed [30]. The thermal properties of the samples were investigated by TGA analysis, and Figure 4 shows the TG and DTG thermograms of lignin and lignin microparticles. For both samples, a varied thermal decomposition was observed, characteristic of their complex structures.

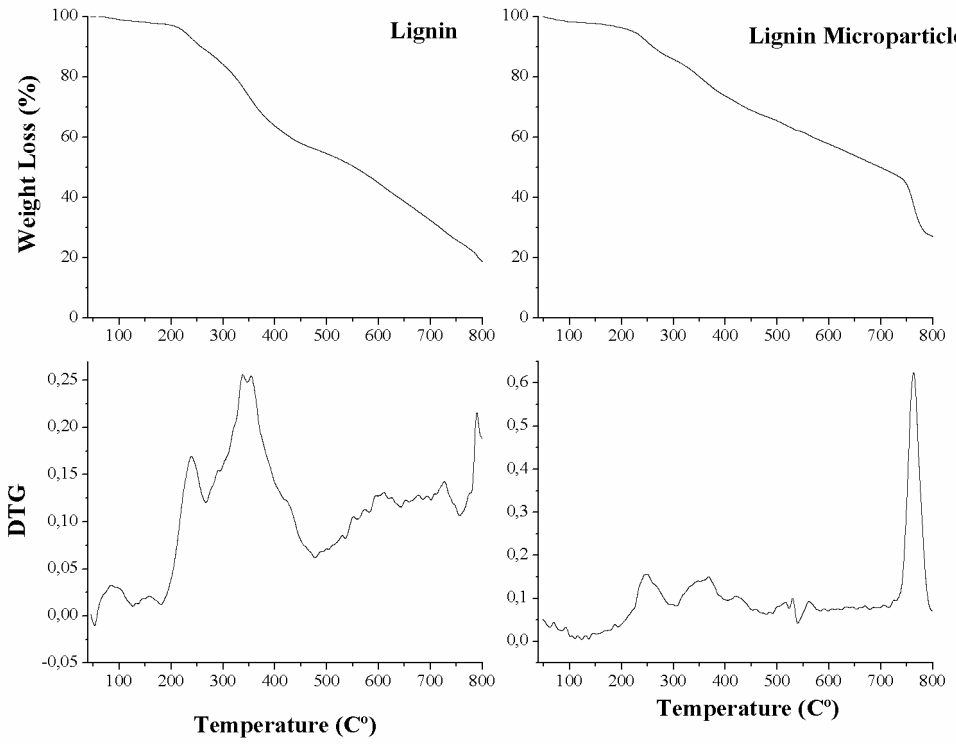


Figure 4. TG and DTG thermograms of lignin and lignin microparticles

In the range between 50 and 150°C a first mass loss was observed for both samples. This phenomenon was associated to moisture release from the sample. A second degradation step was detected from approximately 150 to 300°C and corresponded to the thermal decomposition of lignin-linked hemicelluloses [28]. The non-irradiated lignin sample began to decompose at 181.0°C and showed a maximum degradation peak at 338°C. For the lignin microparticle (all data are not shown in Table 2) the onset of the degradation happened close to 193.0 °C and the maximum weight loss occurred at 715.2 °C. Many authors have related this behavior to the molecular weight of lignin [2]. Therefore, the thermal stability of the lignin microparticle was improved after ultrasonic irradiation.

Studies relate weight loss between 300 and 500 °C with thermal degradation of lignin. This behavior was observed for both samples and an increase of the mass loss rate with the time at the maximum degradation point of the lignin was detected, being almost constant lignin microparticle. This fact, and the lowest degradation rate indicated a low content of hemicelluloses in lignin microparticle. These results are in agreement with those obtained by other authors [31,28], indicating lower hemicellulosic impurities in lignin microparticle.

Finally, an abrupt weight loss above 700 °C was observed in both samples. Such degradation was previously ascribed to the craking of the xylan backbone. In general the lignin final residue that remain after non oxidizing thermal degradation reaches values between 30 and 40%, which could be

smaller when hemicellulosic contamination is detected. García et al. [27] found similar values for final residue of lignin after 60 minutes ultrasound treatment (30.7%) and relates this result to the higher purity of these samples. This fact can be related to the removal of hemicellulosic portions during ultrasound treatment, corroborating once more the results discussed above.

Table 2 Thermal behavior of lignin and LMP by the thermogravimetric analysis

Sample	T_i* (ºC)	T_{max} (ºC)	T_f (ºC)	(%) PM (T_i–T_f)	$Res_{800ºC}$ (%)
Lignin	181.0	338.0	756.9	72.4	18.6
MPL	193.3	715.2	763.1	59.0	27.1

*T_i: initial degradation temperature; T_{max}: maximum degradation temperature; T_f: final degradation temperature; (%) PM (T_i –T_f): percentage of mass loss; $Res_{800ºC}$: residue at 800°C.

3.7. Antioxidant behavior

Total phenolic content (TFC) of the analyzed lignin and LMP samples were 14.81% ± 0.02 and 19.03% ± 0.03, respectively, with statistically differ ($p < 0.05$). Lignin sample presented low TFC, which corroborated those reported in previous works [32].

TFC suffered an abrupt increase of 28% after 60 minutes of sonication. García et al. [27] also found the maximum amount of phenolics in sample isolated after 60 minutes of ultrasonic treatment and correlates with the decreased in hemicelluloses content. So, this fact was probably related to inorganic and hemicellulosic impurities release after ultrasonic treatment, wich was likewise observed in the 3.4 and 3.5 items. In this way, the removal of these interfering compounds resulted in an improvement of TFC.

Oxygen-free radicals can be found naturally or derived from thermal processes or irradiation. The efficiency of free radical scavenging activity of an antioxidant compound depends on the hydrogen atoms exchange reactions and the stability of the radical resulting from the reaction. The antioxidant activity of lignin and lignin microparticles was investigated by the DPPH assay, as it is considered an available free radical and widely used to study the lignin antioxidant potential [33,13].

Table 3 shows the DPPH antioxidant activity of lignin, lignin microparticles, and BHT (synthetic antioxidant) at different concentrations after 30 minutes of incubation. The results show a more intense antioxidant activity for LMP when compared to the conventional lignin. Absorption values at 517 nm decrease with increasing the concentration and antioxidant activity of the samples, reaching a sequestration activity close to 50% to 100mgL^{-1} after 30 minutes of activity. The antioxidant activity of lignin is due to its high number of phenolic groups, which passes through a proton-coupled electron transfer mechanism. Some studies have shown that the greater antioxidant effect of lignin depends on several factors, including a high amount of phenolic groups with or without methoxyl groups, a low amount of aliphatic oxygen-containing groups (such as alcohols, ketones, and esters), low molecular weight, and a narrow polydispersity. During the sonication process, the molecular weight and polydispersity of lignin decreased, as also observed in other studies [19,13,27].

The higher antioxidant activity of LMP when compared to lignin may also be due to possible removal of inorganic materials and hemicellulosic impurities during sonication, exposing portions of lignin with antioxidant activity. In addition, other factors such as increased contact surface area due to the lower particle size of lignin may have contributed to a greater binding capacity of protons for the phenolic groups from LMP.

Table 3. DPPH free radical scavenging activity of different concentrations (mg L^{-1}) of lignin, lignin microparticle (LMP), and BHT in DPPH/methanol solution after 30 minutes of reaction

Sample	Concentration (mg/L)	Absorbance λ = 517nm	RSA* (%)
Lignin	30	1,001 ± 0,002**	$7,91^{a}$ ± 0,19
	50	0,847 ± 0,021	$22,07^{c}$ ± 1,93
	100	0,679 ± 0,015	$37,53^{e}$ ± 1,38
MPL	30	0,888 ± 0,012	$18,30^{b}$ ± 1,10
	50	0,710 ± 0,026	$34,68^{d}$ ± 2,39
	100	0,567 ± 0,024	$47,83^{f}$ ± 2,20
BHT	30	0,859 ± 0,013	$20,97^{b}$ ± 1,20
	50	0,604 ± 0,029	$44,43^{d}$ ± 2,67
	100	0,462 ± 0,020	$57,49^{g}$ ± 1,84

*Averages observed in columns with the same letter do not statistically differ ($p < 0.05$)
**Standard deviation

4. Conclusion

In the present work, ultrasound was applied in kraft lignin. XRD and FTIR confirmed the amorphous behavior and probable maintenance of chemical composition and spatial structure in samples. Zeta potential shows a repulsion characteristic of the lignin microparticles, with a lower probability of agglomeration between them, and consequent greater stabilization. Particle size and scanning electron microscopy confirm the efficiency of ultrasound in reduced de diameter of particles and can be explained mainly due to inorganic and hemicellulosic impurities release after ultrasonic treatment. Antioxidant behavior was also improved and can be explained by the removal of these interfering compounds. The thermal behavior analysis of the samples showed that the ultrasound treatment was able to increase the thermal stability of the lignin microparticle with a decrease in the mass-loss rate with the time. These results show the potential use of lignin microparticles obtained by ultrasound treatment as reinforcing the material and/or antioxidant to biodegradable polymers.

Acknowledgements

Authors thank FAPEMIG (Research Support Foundation of the State of Minas Gerais), CNPq (National Council for Scientific and Technological Development) and CAPES (Coordination of Improvement of Higher Level Personnel) for financial support and scholarships. Authors would like to thank Laboratory of Electron Microscopy and Analysis of Ultrastructural, (http://www.prp.ufla.br/labs/microscopiaeletronica/), of Federal University of Lavras (UFLA) for

supplying equipment and technical support for experiments involving electron microscopy. Authors would like to thank Central of Analysis and Chemical Prospecting of UFLA for supplying equipment and technical support for experiments involving FTIR and TGA analyzes.

References

1. Beisl S, Friedl A, Miltner A (2017) Lignin from micro-to nanosize: Applications. International journal of molecular sciences 18 (11):2367

2. Spiridon I, Poni P, Ghica G, Alley V (2018) Biological and pharmaceutical applications of lignin and its derivatives: a mini-review. CELLULOSE CHEMISTRY AND TECHNOLOGY 52 (7-8):543-550

3. Setälä H, Alakomi H-L, Paananen A, Szilvay GR, Kellock M, Lievonen M, Liljeström V, Hult E-L, Lintinen K, Österberg M, Kostiainen M (2019) Lignin nanoparticles modified with tall oil fatty acid for cellulose functionalization. Cellulose. doi:10.1007/s10570-019-02771-9

4. Zhang N, Tao P, Lu Y, Nie S (2019) Effect of lignin on the thermal stability of cellulose nanofibrils produced from bagasse pulp. Cellulose 26 (13-14):7823-7835

5. Shukla A, Sharma V, Basak S, Ali SW (2019) Sodium lignin sulfonate: a bio-macromolecule for making fire retardant cotton fabric. Cellulose 26 (13-14):8191-8208

6. Chen R, Abdelwahab MA, Misra M, Mohanty AK (2014) Biobased Ternary Blends of Lignin, Poly(Lactic Acid), and Poly(Butylene Adipate-co-Terephthalate): The Effect of Lignin Heterogeneity on Blend Morphology and Compatibility. Journal of Polymers and the Environment 22 (4):439-448. doi:10.1007/s10924-014-0704-5

7. Sathawong S, Sridach W, Techato K-a (2018) Recovery of Kraft Lignin from OPEFB and Using for Lignin–Agarose Hydrogel. Journal of Polymers and the Environment 26 (8):3307-3315. doi:10.1007/s10924-018-1218-3

8. Panzarasa G, Osypova A, Ribera J, Schwarze FWMR, Quasso F, Consolati G (2018) Hybrid Adsorbent Materials Obtained by the Combination of Poly(ethylene-alt-maleic anhydride) with Lignin and Lignosulfonate. Journal of Polymers and the Environment 26 (11):4293-4302. doi:10.1007/s10924-018-1299-z

9. Vanholme R, Demedts B, Morreel K, Ralph J, Boerjan W (2010) Lignin Biosynthesis and Structure. Plant Physiology 153 (3):895-905. doi:10.1104/pp.110.155119

10. Ramezani N, Sain M (2018) Thermal and Physiochemical Characterization of Lignin Extracted from Wheat Straw by Organosolv Process. Journal of Polymers and the Environment 26 (7):3109-3116. doi:10.1007/s10924-018-1199-2

11. Lu Q, Zhu M, Zu Y, Liu W, Yang L, Zhang Y, Zhao X, Zhang X, Zhang X, Li W (2012) Comparative antioxidant activity of nanoscale lignin prepared by a supercritical antisolvent (SAS) process with non-nanoscale lignin. Food Chemistry 135 (1):63-67. doi:https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.04.070

12. Sipponen MH, Lange H, Crestini C, Henn A, Österberg M (2019) Lignin for Nano- and Microscaled Carrier Systems: Applications, Trends, and Challenges. ChemSusChem 12 (10):2039-2054. doi:10.1002/cssc.201900480

13. Yang W, Fortunati E, Gao D, Balestra GM, Giovanale G, He X, Torre L, Kenny JM, Puglia D (2018) Valorization of Acid Isolated High Yield Lignin Nanoparticles as Innovative Antioxidant/Antimicrobial

Organic Materials. ACS Sustainable Chemistry & Engineering 6 (3):3502-3514. doi:10.1021/acssuschemeng.7b03782

14. de Castro e Silva P, de Oliveira ACS, Pereira LAS, Valquíria M, Carvalho GR, Miranda KWE, Marconcini JM, Oliveira JE Development of bionanocomposites of pectin and nanoemulsions of carnauba wax and neem oil pectin/carnauba wax/neem oil composites. Polymer Composites n/a (n/a). doi:10.1002/pc.25416

15. Carvalho R, Oliveira A, Santos T, Dias M, Yoshida M, Borges S (2019) WPI and Cellulose Nanofibres Bio-nanocomposites: Effect of Thyme Essential Oil on the Morphological, Mechanical, Barrier and Optical Properties. Journal of Polymers and the Environment. doi:10.1007/s10924-019-01598-6

16. Kovalcik A, Machovsky M, Kozakova Z, Koller M (2015) Designing packaging materials with viscoelastic and gas barrier properties by optimized processing of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) with lignin. Reactive and Functional Polymers 94:25-34. doi:https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2015.07.001

17. Yang W, Fortunati E, Dominici F, Giovanale G, Mazzaglia A, Balestra GM, Kenny JM, Puglia D (2016) Synergic effect of cellulose and lignin nanostructures in PLA based systems for food antibacterial packaging. European Polymer Journal 79:1-12. doi:https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2016.04.003

18. Yang W, Owczarek JS, Fortunati E, Kozanecki M, Mazzaglia A, Balestra GM, Kenny JM, Torre L, Puglia D (2016) Antioxidant and antibacterial lignin nanoparticles in polyvinyl alcohol/chitosan films for active packaging. Industrial Crops and Products 94:800-811. doi:https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.09.061

19. Gilca IA, Popa VI, Crestini C (2015) Obtaining lignin nanoparticles by sonication. Ultrasonics Sonochemistry 23:369-375. doi:https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2014.08.021

20. Juttuporn W, Thiengkaew P, Rodklongtan A, Rodprapakorn M, Chitprasert P (2018) Ultrasound-Assisted Extraction of Antioxidant and Antibacterial Phenolic Compounds from Steam-Exploded Sugarcane Bagasse. Sugar Tech 20 (5):599-608

21. Goudarzi A, Lin L-T, Ko FK (2014) X-ray diffraction analysis of kraft lignins and lignin-derived carbon nanofibers. Journal of Nanotechnology in Engineering and Medicine 5 (2):021006

22. Kubo S, Kadla JF (2005) Lignin-based Carbon Fibers: Effect of Synthetic Polymer Blending on Fiber Properties. Journal of Polymers and the Environment 13 (2):97-105. doi:10.1007/s10924-005-2941-0

23. Liu Z-H, Hao N, Shinde S, Pu Y, Kang X, Ragauskas AJ, Yuan JS (2019) Defining lignin nanoparticle properties through tailored lignin reactivity by sequential organosolv fragmentation approach (SOFA). Green Chemistry 21 (2):245-260. doi:10.1039/C8GC03290D

24. Mattinen M-L, Valle-Delgado JJ, Leskinen T, Anttila T, Riviere G, Sipponen M, Paananen A, Lintinen K, Kostiainen M, Österberg M (2018) Enzymatically and chemically oxidized lignin nanoparticles for biomaterial applications. Enzyme and Microbial Technology 111:48-56. doi:https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2018.01.005

25. Shulga G, Livcha S, Neiberte B, Verovkins A, Vitolina S, Zhilinska E The effect of pH on the ability of different lignins to stabilize the oil-in-water emulsion. In: IOP Conference Series: Materials Science and Engineering, 2019. vol 1. IOP Publishing, p 012011

26. Santos PSBd, Erdocia X, Gatto DA, Labidi J (2014) Characterisation of Kraft lignin separated by gradient acid precipitation. Industrial Crops and Products 55:149-154. doi:https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.01.023

27. García A, Erdocia X, González Alriols M, Labidi J (2012) Effect of ultrasound treatment on the physicochemical properties of alkaline lignin. Chemical Engineering and Processing: Process Intensification 62:150-158. doi:https://doi.org/10.1016/j.cep.2012.07.011

28. García A, Alriols MG, Llano-Ponte R, Labidi J (2011) Ultrasound-assisted fractionation of the lignocellulosic material. Bioresource Technology 102 (10):6326-6330. doi:https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.02.045

29. Meng L-Y, Ma M-G, Ji X-X (2019) Preparation of Lignin-Based Carbon Materials and Its Application as a Sorbent. Materials 12 (7):1111

30. Yuan T-Q, Sun S, Xu F, Sun R (2011) Isolation and physico-chemical characterization of lignins from ultrasound irradiated fast-growing poplar wood. BioResources 6 (1):414-433

31. Yang B, Zhao M, Shi J, Yang N, Jiang Y (2008) Effect of ultrasonic treatment on the recovery and DPPH radical scavenging activity of polysaccharides from longan fruit pericarp. Food Chemistry 106 (2):685-690. doi:https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.06.031

32. García A, González Alriols M, Labidi J (2012) Evaluation of the effect of ultrasound on organosolv black liquor from olive tree pruning residues. Bioresource Technology 108:155-161. doi:https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.01.010

33. Domenek S, Louaifi A, Guinault A, Baumberger S (2013) Potential of lignins as antioxidant additive in active biodegradable packaging materials. Journal of Polymers and the Environment 21 (3):692-701

ARTIGO 2

BIOPOLÍMEROS DE ISOLADO PROTEICO DE SORO DE LEITE / MICROPARTÍCULAS DE LIGNINA PARA VALORIZAÇÃO DE RESÍDUOS

(VERSÃO PRELIMINAR)

Artigo redigido conforme normas da revista Food Hydrocoloids

Resumo

A lignina e o isolado proteico de soro de leite (IPS) são excelentes matérias-primas para a produção de polímeros por serem biodegradáveis, abundantes e disponíveis como coprodutos da indústria. Neste estudo, biopolímeros de isolado proteico de soro de leite incorporados com micropartículas de lignina (MPL) foram produzidos por *casting* e avaliados quanto à melhoria de suas propriedades através de análises estruturais (DRX e FTIR), morfológicas (MEV), físicas (térmica – DSC e TGA, mecânica, barreira ao vapor de água e cor (L*, a*, b*, C* e transparência) e antioxidante (redução do complexo fosfomolibdênio). Utilizou-se um planejamento inteiramente casualisado sendo quatro biopolímeros variando entre si nas concentrações de MPL (0; 0,25; 0,50 e 0,75% p/p). Pela análise estrutural (DRX e FTIR) observou-se que a adição de MPL aos filmes de IPS não acarretou mudanças na formação de novos tipos de ligações entre as moléculas, porém houve redução da cristalinidade dos filmes, característica da molécula de MPL. Foi observada uma boa dispersão da MPL pela matriz dos tratamentos adicionados de concentrações intermediárias (0,25% e 0,50% MPL) de acordo com a análise de MEV. Nestas condições, houve melhoria das propriedades térmicas (aumento da Tg em até 13,46°C), aumento da temperatura de início de evaporação de umidade e de degradação de glicerol, aumento das propriedades mecânicas (35% mais resistentes) e redução da barreira ao vapor de água (12 e 16%). A cor dos filmes também foi modificada pela adição da MPL, com formação de materiais mais escuros (aumento de L*), avermelhados (a* e *h**), amarelos (b*), mais saturados (C*) e mais transparentes. Os filmes adicionados de MPL apresentaram potencial antioxidante com maior valor para a maior concentração testada (0,75% p/p). A adição de 0,25 e 0,50% (p/p) de MPL aos filmes de IPS resultaram em filmes com potencial de aplicação em alimentos por trazer melhoria de suas propriedades físicas e atividade antioxidante.

Palavras-chave: blendas poliméricas; propriedades estruturais; propriedades mecânicas; propriedades de barreira; antioxidante.

1 Introdução

A lignina é um polímero amorfo natural, abundante e de baixo custo, sendo produzido em grande quantidade como um coproduto da indústria de celulose, papel e biorrefinarias de etanol. A lignina é o segundo maior componente da madeira, atrás da celulose, e pode representar de 18-35% de sua matéria seca. Também pode ser encontrada em frutas e vegetais, representando cerca de 20% da biomassa no mundo (Crouvisier-Urion et al., 2019). A definição exata da composição química da lignina é difícil pois sua estrutura pode variar de acordo com a origem botânica que interfere na relação e no padrão de polimerização dos monômeros que a compõem: álcool ρ-cumarílico, álcool coniferílico e álcool sinapílico. Além disso, método de extração também modifica sua estrutura pois pode haver

contaminação por substâncias químicas não nativas. A lignina é um importante polímero estrutural para a parede celular das plantas, promovendo proteção antimicrobiana, baixa permeabilidade, alta resistência mecânica e atividade antioxidante devido à presença de grupamentos hidroxila nos anéis aromáticos (Laurichesse & Avérous, 2014).

Normalmente a lignina é utilizada como combustível de baixo custo. No entanto, estudos recentes descrevem o uso desse co-produto na produção de polímeros de alto valor agregado (Alzagameem et al., 2019; Xing et al., 2019; W. Yang et al., 2018a). O aumento das propriedades mecânicas e de barreira ao vapor de água são relatadas para filmes biodegradáveis a partir da adição de lignina (Kovalcik, Machovsky, Kozakova, & Koller, 2015; Shankar, Reddy, & Rhim, 2015). Além disso, sua incorporação a embalagens de alimentos também pode conferir propriedades antioxidante e de barreira à luz UV a esses materiais, que aumenta a vida útil do produto acondicionado (Crouvisier-Urion et al., 2019; He et al., 2019; Xing et al., 2019). As micro ou nanopartículas de lignina também são estudadas para melhoria de polímeros biodegradáveis pois podem ser utilizadas em uma menor quantidade, devido à sua maior área superficial específica, apresentando propriedades superiores aos materiais adicionados de lignina em tamanho macrométrico (Kovalcik et al., 2015; W. Yang et al., 2018a, 2016).

A valorização de materiais pela adição de lignina ou sua micropartícula pode ocorrer em matrizes poliméricas de origem sustável como quitosana, gelatina, amido, proteína de soja (Aadil, Prajapati, & Jha, 2016; Alzagameem et al., 2019; Julinová, Slavík, Vyoralová, Kalendová, & Alexy, 2018). O isolado proteico de soro de leite (IPS) é um material polimérico promissor para a substituição dos plásticos convencionais devido à sua boa capacidade em formar filmes, elevada transparência e excelente permeabilidade ao oxigênio (Hammam, 2019). O IPS também é um coproduto da indústria de queijos que pode ser valorizado. Sua composição depende do tipo de método de coagulação usado no preparo do queijo, mas é composto principalmente por proteínas β-lactoglobulina, α-lactoalbumina, albumina sérica e imunoglobulina (Hammam, 2019).

No entanto, o IPS e a lignina não são polímeros termodinamicamente compatíveis pois o IPS é hidrofílico e solúvel em fase aquosa, enquanto a lignina na maioria das vezes é hidrofóbica e solúvel em fase orgânica. Devido a essa fraca compatibilidade, a incorporação física da lignina na matriz de IPS leva a formação de um sistema heterogêneo onde aglomerados de lignina são dispersos dentro da matriz polimérica. Porém, tratamentos físicos como alta pressão e utilização de banho ultrassônico, e utilização de agentes plastificantes, como o glicerol, podem aumentar a dispersão da lignina pela matriz polimérica e favorecer o aprimoramento de algumas de suas propriedades (Crouvisier-Urion et al., 2019).

O objetivo deste estudo foi de investigar o uso de diferentes concentrações de micropartícula de lignina (MPL) na melhoria das propriedades estruturais (DRX e FTIR), morfológicas (MEV), físicas (térmica – DSC e TGA, mecânica, barreira ao vapor de água e cor (L*, a*, b*, C* e transparência) e

antioxidante (redução do complexo fosfomolibdênio) de filmes biodegradáveis de isolado proteico de leite (IPS).

2 Material e métodos

2.1 Material

Lignina isolada de licor negro *kraft* foi cedida pelo Laboratório de Produtos Bioativos e Soluções Tecnológicas da Universidade Federal de Viçosa (Campus Rio Paranaíba) para a produção da micropartícula de lignina (MPL). Isolado proteico de soro de leite (IPS9400) da *Hilmar Ingredients*® com 93,8% de proteína. Glicerol da *Sigma Aldrich*®.

2.2 Produção da micropartícula de lignina (MPL)

Foi utilizada uma suspensão aquosa de lignina *kraft* (0,7% p/v) com pH ajustado para 2,0 com solução de H_2SO_4 1N. A suspensão foi passada em sonicador durante 60 minutos resultando em uma microdispersão estável e seca sob condições amenas (60°C/24h) antes de ser utilizada (Gilca, Popa, & Crestini, 2015). O sonicador (Sonifier Cell Disruptor Branson model 450D, Manchester, UK) foi usado a uma frequência de 20KHz e 400W. A caracterização das micropartículas foi realizada e apresentada por Alvarenga et al. (2020).

2.3 Planejamento experimental

Foi utilizado um delineamento inteiramente casualisado (DIC), onde as concentrações de MPL variaram de 0 (controle); 0,25; 0,50 e 0,75% (p/p), sendo os filmes denominados de FC, MPL2, MPL5 e MPL7, respectivamente. O experimento foi conduzido em três repetições.

2.4 Produção dos polímeros biodegradáveis

Os polímeros biodegradáveis de IPS e MPL foram preparados utilizando o método *casting* descrito por Azevedo et al. (2015), que consiste na secagem dos filmes por evaporação do solvente. As MPL quando adicionadas, foram incorporadas à solução de glicerol para agitação.

2.5 Condicionamento e espessura dos filmes

Após retirados, os filmes foram acondicionados em BOD a 25°C ± 2°C e 50% ± 5% de umidade relativa por 48 horas antes do início das análises de acordo com o método D618-00 (ASTM, 2000). A média da espessura dos filmes foi realizada a partir da medição de dez pontos distintos, escolhidos de modo aleatório pelos corpos de prova usando micrometro digital *Mitutoyo* com precisão de 0.01mm (Mitutoyo, Suzano, SP, Brasil).

2.6 Difração de raio-X (DRX)

A análise de DRX foi realizada em difratômetro Shimadzu XRD-6000 (Shimadzu Tokyo Japão) com filtro de radiação de Cu-$k_{\alpha 1}$ (λ = 1.5406Å), operando a 30kV e 30mA. As amostras foram fixadas em suporte de alumínio e analisadas em taxa de varredura de 4°/min, com 2θ variando de 4 a 70°, em temperatura de 25±2°C. As curvas foram analisadas utilizando o software Origin® 8.0 e o índice de cristalinidade relativa (Ic) dos biopolímeros foram calculados de acordo com a equação 1 (Segal, Creely, Martin, & Conrad, 1959):

$$Ic = 1 - (I_{min} / I_{máx}) * 100 \quad (1)$$

Onde: Ic é o índice de cristalinidade (%); I_{min} é a intensidade mínima obtida entre os picos localizados a 2θ = 14,0 e 16,9°; $I_{máx}$ = é a intensidade máxima do pico cristalino localizado a 2θ = 16,9°.

2.7 Análise de FTIR

A análise de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) foi realizada em espectrofotômetro FTS3000 Excalibur Digilab (Estados Unidos) equipado com detector ATR, intervalo espectral de 400-4000cm^{-1}, 64 scans e 4cm^{-1} de resolução.

2.8 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A morfologia dos biopolímeros foram realizadas em microscópio eletrônico de varredura LEO Evo 40 (*Zeiss*, Cambridge, Inglaterra) do Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural da UFLA com voltagem de aceleração de 20kV. Foram obtidas imagens da superfície dos filmes e do interior por fratura criogênica. As amostras foram montadas em "stubs" de alumínio com fita dupla de carbono e metalizadas em aparelho evaporador de ouro (SCD 050).

2.9 Análises térmicas

2.9.1 Análise termogravimétrica (TGA)

A estabilidade térmica e perfil de degradação dos polímeros biodegradáveis foram determinados por análise termogravimétrica (TGA) em aparelho DTG60H-SHIMADZU (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão). A análise foi realizada sob atmosfera de nitrogênio com taxa de fluxo de 50mL/min, aquecimento de 25 a 500°C, razão de aquecimento de 10°C/min e peso da amostra de 5mg.

2.9.2 Calorimetria diferencial de varredura (DSC)

A análise de calorimetria diferencial de varredura (DSC) foi realizada em calorímetro DSC60-SHIMADZU (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão). Os parâmetros utilizados para a análise foram: peso da amostra de 4-6mg e taxa de aquecimento de 10°C/min. A sequência utilizada foi: 1) aquecimento de 25 a 200°C com o objetivo de se eliminar a história térmica; 2) resfriamento do material de 200 a -50°C; 3) novo aquecimento até 200°C (ASTM D3417; ASTM D3418). A partir das curvas de DSC, a temperatura de transição vítrea (Tg) foi analisada.

2.10 Propriedades mecânicas

As análises de perfuração e tração foram realizadas no Departamento de Ciência dos Alimentos da UFLA, em Analisador de Textura Stable Micro Systems (modelo TA-XT2, Inglaterra), com célula de carga de 1kN. Para a análise de perfuração, as amostras dos filmes foram cortadas em quadrados de 3x3cm, submetidas às medidas de espessura em 4 pontos distintos, e fixadas em um suporte metálico com orifício central para passagem da sonda de forma perpendicular. Os parâmetros utilizados durante o teste foram: sonda esférica de 5,0mm de diâmetro (sonda P/5S), velocidade de deslocamento da sonda de 0,8mm/s e distância percorrida por ela após tocar a amostra de 1cm. Para cada tratamento foram analisados 15 corpos de prova (ASTM F1306-90, 2002). A resistência à perfuração/espessura (RP, N/mm) foi calculada por meio da divisão do valor da força máxima obtida no ponto de ruptura pela espessura do filme, com o objetivo de se eliminar o efeito da variação da espessura sobre os resultados. Já a deformação (D, mm) foi determinada por meio do ponto de ruptura dos corpos de prova.

Para o teste de tração, as amostras foram cortadas em tiras de 10x1,5cm; medidas as espessuras em 3 pontos distintos e fixadas no suporte da sonda pelas duas extremidades. Os parâmetros utilizados durante a análise foram: separação inicial entre as garras de 50mm e velocidade de deslocamento de 0,8mm/s. Para cada tratamento foram analisados 15 corpos de prova (ASTM D882-02, 2002). A resistência máxima à tração (RT, Mpa) foi calculada pela divisão da força máxima pela área transversal

do corpo de prova. A porcentagem de alongamento na ruptura (ALR) foi calculada pela relação entre o alongamento do corpo de prova e seu comprimento inicial. Para o módulo de elasticidade (ME, Mpa) traçou-se uma tangente à curva tensão de tração *versus* deformação na região linear (região elástica), calculando a razão entre a tensão e a deformação correspondente (Sarantópoulos et al., 2002).

2.11 Propriedades de barreira ao vapor de água

A permeabilidade ao vapor de água foi realizada pelo método gravimétrico. Os corpos de prova de cada tratamento foram cortados em discos de 8cm de diâmetro e fixados em cápsulas contendo solução saturada de NaCl e umidade relativa de 75 ± 3% sob temperatura de 25 ± 1°C. Estas foram acondicionadas em dessecadores com sílica-gel em seu interior. Após a montagem das cápsulas, fez-se a pesagem em intervalos de 1 hora durante 8 horas para se obter a perda de peso relacionada à transferência de vapor de água através do filme (ASTM E96-00, 2005). A taxa de permeabilidade ao vapor de água e a permeabilidade ao vapor de água foram calculadas segundo as Equação 2 e 3, respectivamente:

$$TPVA = G/t \,.\, A \qquad (2)$$

Onde: TPVA é a taxa de permeabilidade ao vapor de água (g água/(m².dia)); G/t é o coeficiente angular da reta (g água/dia) e A é a área de permeação do corpo de prova (m²).

$$PVA = \frac{TPVA \,.e}{ps\,(UR1-UR2)} \qquad (3)$$

Onde: PVA é a permeabilidade ao vapor de água (g m^{-1} s^{-1} Pa^{-1}); TPVA a taxa de permeabilidade ao vapor de água; *e* é a espessura média do corpo de prova (μm); ρs a pressão de saturação de vapor de água à temperatura de ensaio (2809 kPa); UR1 umidade relativa da câmara e UR2 umidade relativa do interior da cápsula.

2.12 Propriedades ópticas

Os parâmetros obtidos pela análise de cor foram: *L**, *a**, *b**, índice de saturação (*C**) e *hue (h)*. A análise de cor dos filmes foi realizada no Laboratório de Embalagens da UFLA, e medida utilizando um colorímetro espectrofotométrico modelo CM-700 (Kônica 53 Minolta, Japão), com fonte de luz D65,

ângulo observador de 10° e reflectância especular incluída (SCI). As leituras foram realizadas com os filmes sobrepostos em papel de coloração branca.

A transparência dos filmes foi medida em espectrofotômetro Bel SPECTRO S-2000 (Monza, Itália) a 600nm, retirando-se a medida de porcentagem de transmitância (%T), segundo ASTM D1746-03 (ASTM D1746-03, 2003). Os filmes foram cortados em pedaços de 3x1cm e fixados de forma a permitir que o feixe do equipamento atravessasse os corpos de prova sem nenhum obstáculo. A transparência (T) foi calculada de acordo com a Equação 4:

$$T = (\text{Log } \%T) / \delta \quad (4)$$

Onde: δ é a espessura do filme (mm).

2.13 Potencial antioxidante dos biopolímeros

Para análise do potencial antioxidante pelo método de redução do complexo fosfomolibdênio foi utilizado o extrato dos biopolímeros de acordo com metodologia proposta por Yang et al. (2018) com algumas modificações. 0,1g de amostra foi pesada e cortada em pequenos pedaços, adicionado de 3mL de metanol 80% e mantido sob agitação constante durante 3 horas em temperatura ambiente (25°C ± 2°C) e ao abrigo de luz. Após esse período os extratos estavam prontos para serem utilizados.

2.13.2 Redução do complexo fosfomolibdênio

A avaliação da atividade antioxidante por meio do método de redução do complexo fosfomolibdênio foi realizada de acordo com metodologia de Naik et al. (2013) com algumas modificações. 0,4mL do extrato foram misturados a 4 mL da solução reagente contendo ácido sulfúrico (0,6 M), fosfato de sódio (28 mM) e molibdato de amônio (4 mM) em vórtex e incubados em banho-maria a 95°C por 60 minutos. Juntamente às amostras, também foi preparado o branco contendo 4 mL de solução reagente e 0,4 mL de metanol. Em seguida, a solução foi resfriada à temperatura ambiente e a absorbância lida em 695nm (espectrofotômetro Bel SPECTRO S-2000, Monza, Itália). A atividade antioxidante foi expressa em mg de ácido ascórbico/g com utilização de uma curva de calibração de solução padrão de ácido ascórbico (vitamina C).

3 Resultados e discussão

3.1 Difração de raio-X (DRX)

A análise de difração de raio-X foi realizada com o objetivo de se investigar a estrutura cristalina dos biopolímeros e os difratogramas obtidos são mostrados na Figura 1.

O difratograma da MPL pura (Figura 1a), que consiste em um polímero formado por uma rede tridimensional de ligações e sem estrutura molecular ordenada e regular, mostra uma banda ampla, mostrando sua natureza amorfa (Iglesias Montes et al., 2019). O mesmo resultado foi encontrado por outros estudos (de Melo, Fornazier Borges, Afonso Ferreira, Vicente Barbosa Silva, & Ruggiero, 2018; Laurichesse & Avérous, 2014). O IPS puro pode apresentar cristais de lactose dando característica cristalina ao material, porém o que normalmente ocorre é o desaparecimento desses cristais durante a secagem do soro de leite para a formação do produto, tornando o material amorfo (Azevedo et al., 2015).

Os difratogramas dos filmes (Figura 1b, 1c, 1d e 1e) mostram dois picos intensos localizados em 14,0° e 16,9° para os quatro tratamentos sendo que adição de MPL não interferiu na estrutura dos filmes no que diz respeito a formação de novos picos de cristalinidade.

Os picos identificados podem ser explicados por um possível desnovelamento das proteínas globulares do IPS durante o aquecimento e irradiação das soluções filmogênicas por ultrassom e posterior recristalização das moléculas do peptídeo durante o resfriamento para formação dos filmes, já que ocorreu a formação de novos picos quando comparados ao difratograma do IPS em pó (Azevedo et al., 2015). Ao estudarem o efeito da irradiação e aquecimento em filmes de IPS e celulose, Le Tien et al. (2000) explicam que o aquecimento das proteínas do IPS induz a mudanças em sua conformação, tornado as moléculas mais estáveis e ordenadas, com aumento da intensidade dos picos e maior cristalinidade.

O índice de cristalinidade dos filmes diminuiu com o aumento da concentração de MPL o que pode ser explicado pela característica amorfa da MPL, que induz à uma mudança no arranjo das moléculas, levando a formação de uma estrutura menos ordenada e estável (Iglesias Montes et al., 2019; Le Tien et al., 2000). Comparando os tratamentos, observa-se uma diminuição mais intensa da cristalinidade para o filme MPL7, com redução de 27,6% no Ic comparado ao C. A redução da cristalinidade de um polímero pode diminuir suas propriedades mecânicas e de reforço, que foi confirmado para o tratamento MPL7, como será discutido a seguir. Espinosa et al. (2019) encontraram diminuição do Ic de filmes incorporados com lignina e relacionam o resultado à característica amorfa da molécula.

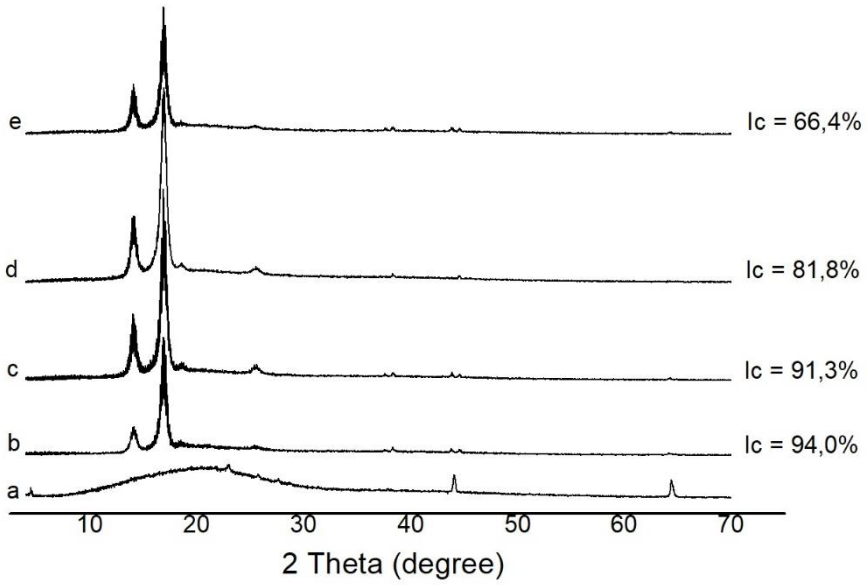


Figura 1 Difratogramas da MPL (a) e biopolímeros de IPS controle FC (b) e adicionados de 0,25 (MPL2, c), 0,50 (MPL5, d) e 0,75% (MPL7, e) de MPL com seus respectivos índices de cristalinidade (Ic).

3.2 Análise de FTIR

A análise de espectroscopia na região do infravermelho (FTIR) é realizada para determinar possíveis interações e mudanças estruturais dos compostos analisados. A Figura 2 mostra os espectros da análise de FTIR do IPS puro, MPL pura e biopolímeros no alcance de 4000 a 400cm^{-1}.

Observa-se o aumento do número de picos e suas intensidades nos espectros dos biopolímeros comparados aos espectros dos materiais utilizados para sua síntese (MPL e IPS puros), porém entre os biopolímeros não houve a formação de novos picos, confirmando os resultados obtidos pela DRX, ou seja, a adição da MPL não ocasionou a formação de novos tipos de ligações e/ou mudança na estrutura dos biopolímeros (Shankar & Rhim, 2017).

Os principais picos de absorção encontrados para os biopolímeros estão relacionados a presença das seguintes ligações: os picos compreendidos entre 500 e 750cm^{-1} às absorções de ligações de glicerol; os picos entre 900 e 1150cm^{-1} estão relacionados às ligações N-H e ligações de estiramento C-H (amida tipo III) nos filmes; os picos entre 1400 e 1550cm^{-1} estão relacionados às ligações de flexão entre N-H (amida tipo II); os picos compreendidos entre 1600 e 1700cm^{-1} estão relacionados às vibrações de estiramento de ligações C=O e C-N (amida tipo I) que apresentaram diminuição da intensidade da banda com a incorporação de MPL. Essa região do espectro está relacionada à presença de proteínas secundárias e durante o aquecimento das soluções filmogênicas elas perdem essa conformação para a formação de outras ligações com os constituintes e assim as bandas características dessa estrutura inicial diminuem. Outra possível explicação para essa diminuição é o “efeito de diluição” da proteína pela

substituição parcial do IPS pela MPL (Hammann & Schmid, 2014; Núñez-Flores et al., 2013). Os picos compreendidos entre 2850 e 2980cm^{-1} estão relacionados às ligações de estiramento C-H e também observa-se uma diminuição da intensidade do pico compreendido entre 2930cm^{-1} relacionado principalmente a ligações de carbonos primários e secundários (CH_3 e CH_2); os picos compreendidos entre 3000 e 3600 cm^{-1} estão relacionados a grupos O-H e N-H livres ou ligados (Ramos et al., 2013).

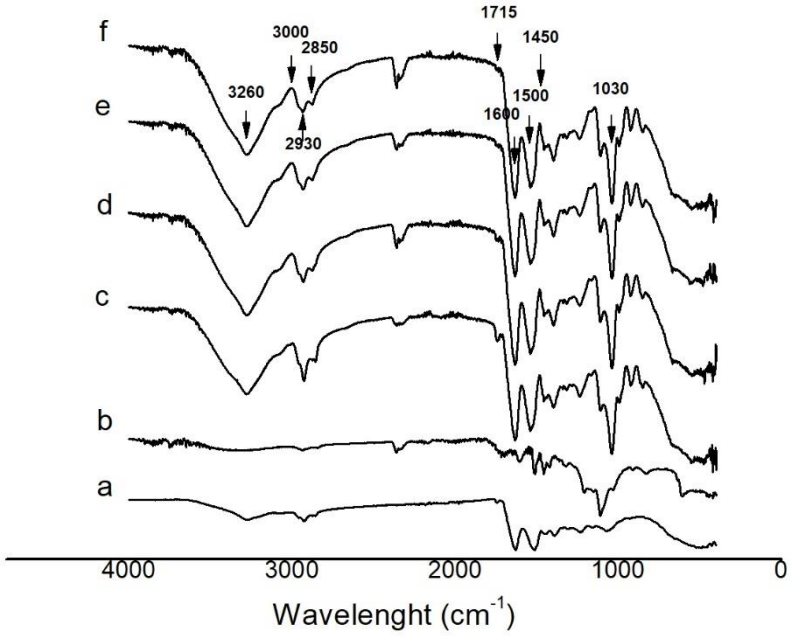


Figura 2 Espectros de FTIR de IPS (a) e MPL (b) puros e biopolímeros de IPS controle FC (c) e adicionados de 0,25 (MPL2, d), 0,50 (MPL5, e) e 0,75% (MPL7, f) de MPL.

3.3 Microscopia eletrônica de varredura

A Figura 3 representa as micrografias das superfícies e interior dos biopolímeros de IPS adicionados de MPL por meio da análise de MEV.

O biopolímero controle (Figura 3a) apresentou superfície e interior lisos e homogêneos. A MPL nos demais filmes caracteriza-se por grânulos distribuídos por toda a superfície e também interior (Tavares, Ito, Salvadori, dos Santos, & Rosa, 2018). De acordo com as imagens, observa-se uma boa dispersibilidade das MPL por toda a superfície dos biopolímeros MPL2 e MPL5 (Figura 3b.1 e 3c.1) e uma tendência de aglomeração das MPL, com maior presença de superfícies lisas em meio a aglomerados de MPL e formação de fissuras e buracos na superfície do filme MPL7 (Figura 3d.1).

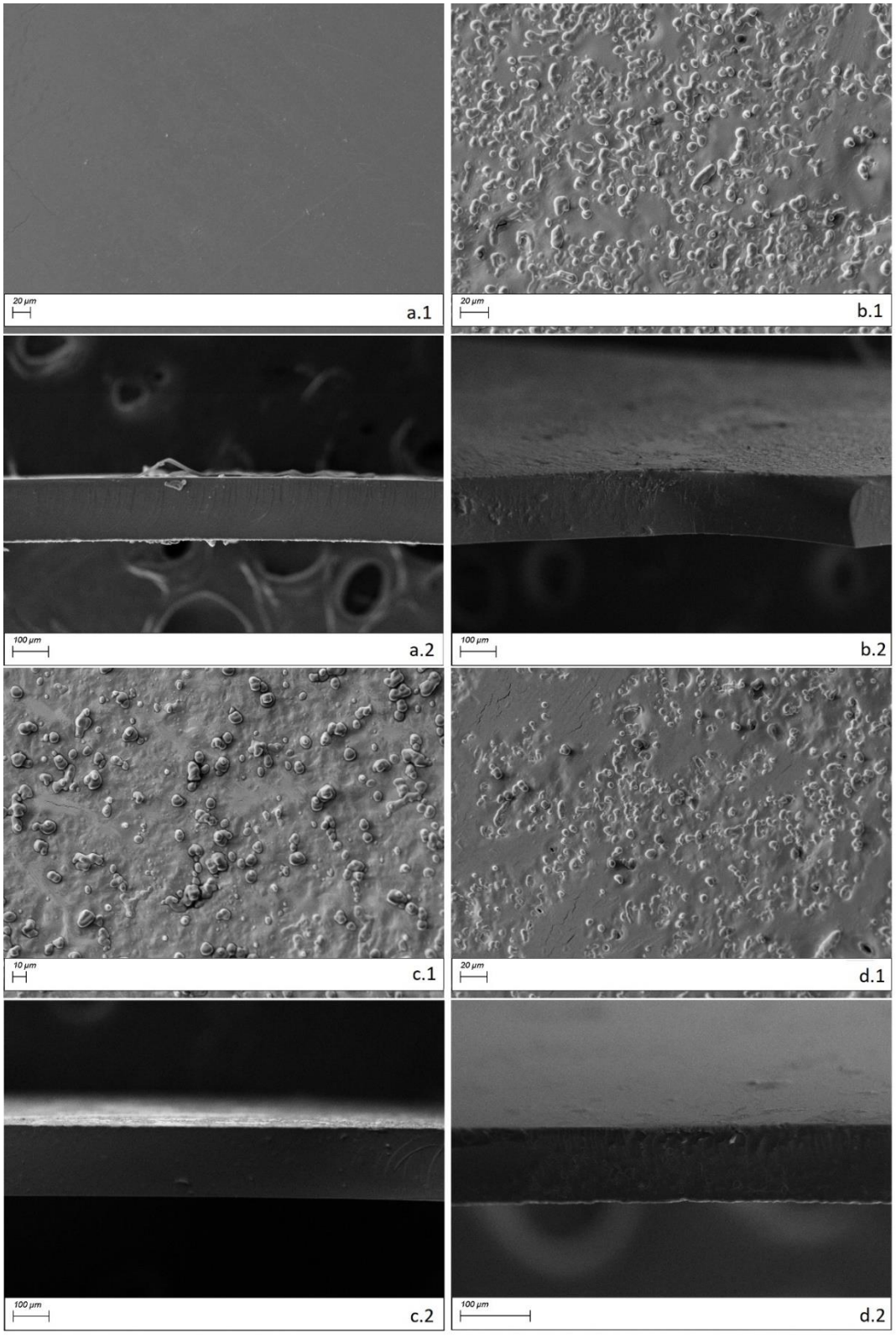


Figura 3 Micrografias de superfície (500x) e interior (200x) de biopolímeros de IPS controle FC (a.1 e a.2) e adicionados de 0,25 (MPL2; b.1 e b.2), 0,50 (MPL5; c.1 e c.2) e 0,75% (MPL7; d.1 e d.2) de MPL.

Estudos também encontraram resultados semelhantes de aglomeração das partículas de lignina quando adicionadas em concentrações diferentes (10; 20; 30%) a vários tipos de matrizes poliméricas e relacionam o fato à tendência de formação de ligações intermoleculares entre as moléculas de lignina do tipo Van der Waals e ligações de hidrogênio (Crouvisier-Urion et al., 2016; Tavares et al., 2018). Essa formação de aglomerados, fissuras e buracos na superfície do filme pode interferir negativamente nas propriedades térmicas, mecânicas e de permeabilidade ao vapor de água.

Possíveis explicações para a boa dispersão observada nos tratamentos com concentrações intermediárias de MPL são: além da concentração ideal para que as partículas dispersas pudessem apresentar uma distância entre elas que não favorecesse sua atração intermolecular, a melhor dispersão pode estar relacionada também à presença de grupamentos hidroxila no plastificante glicerol, que se uniria a porções hidrofílicas das moléculas de IPS e regiões de característica hidrofílica na molécula de MPL. A utilização de radiação ultrassônica na metodologia de produção dos filmes também pode favorecer a miscibilidade da MPL. Além de não haver a formação de aglomerados, não se nota a presença de fissuras e buracos na superfície desses filmes o que também contribui para a o efeito positivo no reforço das propriedades térmicas, mecânicas e de barreira ao vapor de água desses tratamentos descritas a seguir.

3.4 Análise térmica

3.4.1 Análise termogravimétrica (TGA)

A análise termogravimétrica (TGA) e derivada termogravimétrica (DTG) foram realizadas com o objetivo de se determinar a estabilidade térmica dos biopolímeros de IPS adicionados de MPL. As curvas resultantes das análises estão representadas na Figura 4 e o comportamento térmico dos filmes se encontra na Tabela 1.

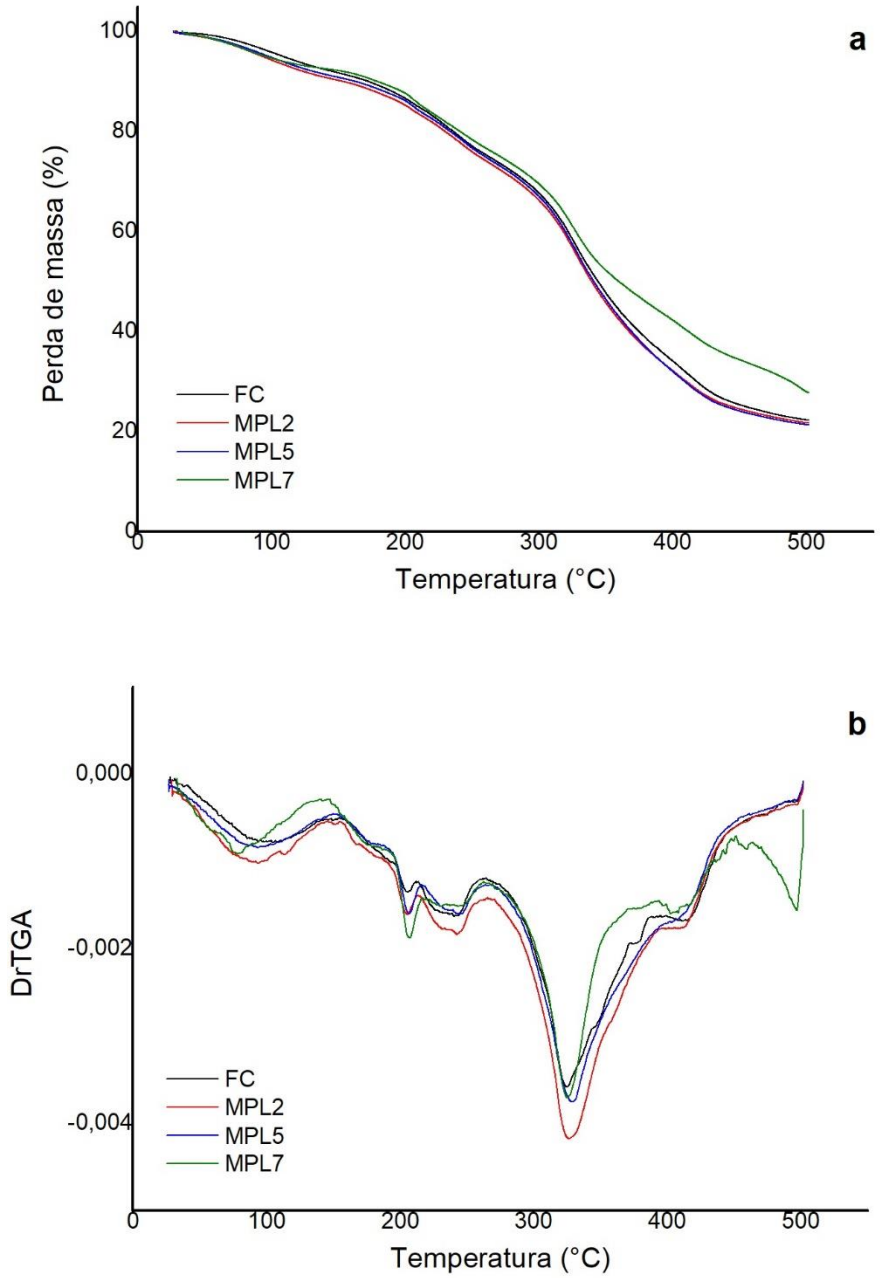


Figura 4 Curvas de TGA (a) e DTG (b) de biopolímeros de IPS controle FC e adicionados de 0,25 (MPL2), 0,50 (MPL5) e 0,75% (MPL7) de MPL.

Tabela 1 Comportamento térmico dos biopolímeros IPS controle (FC) e adicionados de 0,25 (MPL2), 0,50 (MPL5) e 0,75% (MPL7) de MPL

Filmes	Ti*(°C)	T_{max} (ºC)	T_f (ºC)	(%) PM (T_i–T_f)	$Res_{500ºC}$ (%)
FC	226,69	325,15	498,80	74,85	19,39
MPL2	241,84	326,77	496,50	73,03	21,75
MPL5	243,44	330,96	499,79	73,97	21,39
MPL7	230,26	324,61	499,80	68,68	27,98

*T_i: temperatura inicial de degradação; T_{max}: temperatura de degradação máxima; T_f: temperatura final de degradação; (%) PM (T_i –T_f): porcentagem de perda de massa; $Res_{500ºC}$: residuo a 500°C.

O padrão de decomposição dos filmes de IPS controle e adicionados de MPL apresentaram quatro etapas sendo elas: eliminação da umidade, degradação do glicerol, degradação das MPL e do IPS.

O primeiro pico presente abaixo dos 100°C pelas curvas de DTG corresponde à perda de umidade das amostras (variando de 84,70 a 93,88°C). A segunda etapa de perda de peso corresponde ao início da degradação dos compostos sendo a primeira etapa correspondente à degradação do glicerol utilizado como plastificante (Tabela 1). O aumento da temperatura inicial de degradação dos filmes adicionados de MPL nas concentrações intermediárias pode ser explicado pela boa dispersão dessas partículas pelo filme (como foi confirmado no item 3.3) se comportando como material de barreira às degradações dos demais compostos da blenda polimérica (Weijun Yang et al., 2015). E da mesma forma, o valor de temperatura semelhante ao FC encontrado para o tratamento MPL7 (230,26°C) pode ser explicado pelas imperfeições formadas na estrutura do filme devido a aglomeração das MPL com formação de caminhos preferenciais, fissuras e buracos, facilitando a passagem das moléculas de água e glicerol por evaporação.

A degradação do IPS começou em torno de 266°C para os quatro tratamentos, semelhante ao encontrado por outros estudos (Azevedo et al., 2015) e acontece concomitantemente à decomposição das MPL que começam a partir de 149,69°C para a amostra MPL7, 154,78 para MPL2 e 155,37 para MPL5 e se prolongam até o fim da temperatura testada (500ºC). Essa ampla faixa de decomposição da lignina decorre da complexidade estrutural da sua molécula, que apresenta grande número de anéis aromáticos e ramificações, podendo acontecer entre 100-900°C (H. Yang, Yan, Chen, Lee, & Zheng, 2007). Ainda, a adição de MPL na maior concentração (0,75% p/p) acarretou o aumento do peso residual que pode ser explicado possivelmente pela maior quantidade desse material ainda presente no filme.

Esses resultados, junto aos obtidos na análise de DSC demonstram que as MPL não apenas podem melhorar a estabilidade térmica, mas também fornecer uma barreira de bloqueio a permeabilidade a gases e umidade nos filmes de IPS, como será confirmado pelos resultados da análise de permeabilidade ao vapor de água.

3.4.2 Calorimetria diferencial de varredura (DSC)

Neste estudo, o valor de Tg aumentou a partir da adição de MPL aos filmes de IPS como apresentado na Tabela 1, chegando ao maior aumento de 13,46° para o filme MPL2 comparado ao FC (Tabela 2). Esse resultado caracteriza polímeros com estruturas mais rígidas e ligações mais fortes e com diminuição da mobilidade de sua cadeia, que pode ser explicado pela presença de grupamentos -OH na matriz polimérica de IPS e glicerol que se ligam a partes hidrofílicas da molécula de MPL criando uma forte energia de ligação entre a partícula e a matriz polimérica. Ainda, Segundo Yang et al. (2015) a lignina é capaz de formar uma forte interação intermolecular nas cadeias poliméricas, no caso de IPS,

resultando em menor mobilidade molecular, aumentando a Tg e melhorando a estabilidade térmica do biopolímero. O aumento da Tg de filmes de diversas bases poliméricas a partir da adição de nanopartículas de lignina ou lignina *kraft* também foram reportados anteriormente por alguns autores (Duval, Molina-Boisseau, & Chirat, 2013; Klanwan, Kunanopparat, Menut, & Siriwattanayotin, 2016; Weijun Yang et al., 2015).

Tabela 2 Temperatura de transição vítrea dos biopolímeros IPS controle (FC) e adicionados de 0,25 (MPL2), 0,50 (MPL5) e 0,75% (MPL7) de MPL

Filmes	Tg* (°C)
FC	1,21
MPL2	14,67
MPL5	4,57
MPL7	3,72

*Tg: Temperatura de transição vítrea.

Materiais que apresentam estruturas amorfas ou parcialmente amorfas passam por uma transição de seu estado rígido, sólido e vítreo para um estado semelhante à borracha ou altamente viscoso a uma temperatura específica chamada de temperatura de transição vítrea (Tg). Ela acontece quando a energia térmica cria volume livre suficiente no sistema para permitir o movimento das cadeias poliméricas, sendo que esse fenômeno se manifesta pela mudança na linha base da curva DSC indicando uma alteração na capacidade de aquecimento do polímero (Azevedo, Silva, Pereira, da Costa, & Borges, 2015).

O estudo desse parâmetro é muito importante em materiais biodegradáveis e sintéticos por sua influência sobre o uso destes polímeros. Normalmente, os valores de Tg aumentam com o aumento de cadeias e ligações rígidas, grupos laterais, ligações cruzadas entre as cadeias e o grau de cristalinidade dos polímeros; e diminui de acordo com o aumento de plastificantes de baixo peso molecular, como a água e o glicerol (Galietta, Di Gioia, Guilbert, & Cuq, 1998).

Valores de Tg para filmes de IPS reportados na literatura podem variar dependendo do grau de pureza do IPS, método de produção dos filmes (casting ou extrusão) e aditivos utilizados como plastificantes e partículas de reforço. Erdem et al. (2019) encontraram valores de Tg variando de 50°C a 93°C para filmes de IPS produzidos por *casting* adicionados de óleo de girassol. Ramos et al. (2013) encontraram valores entre 36,5°C e 50,2°C para filmes de IPS e CPS (concentrado – 82% de proteína) com diferentes concentrações de glicerol como plastificante.

3.5 Propriedades mecânicas

As propriedades de resistência de biopolímeros de IPS puro são um fator limitante para sua utilização. Portanto, o estudo de seu aprimoramento é imprescindível durante o desenvolvimento de

novos materiais. A adição de MPL foi significativa ($p<0,05$) para os parâmetros avaliados pelo teste de punctura (RP e D) e para o teste de tração (RT, ALR e ME), conforme Tabela 3.

Tabela 3 Valores dos parâmetros de resistência mecânica dos biopolímeros IPS controle (FC) e adicionados de 0,25 (MPL2), 0,50 (MPL5) e 0,75% (MPL7) de MPL

Filmes	RP (N/mm)	D (mm)	RT (Mpa)	ALR (%)	ME (Mpa)
FC	$11,74^{a} \pm 1,68$	$3,61^{a} \pm 0,46$	$4,75^{a} \pm 0,30$	$319,66^{a} \pm 16,46$	$0,50^{a} \pm 0,04$
MPL2	$15,95^{b} \pm 2,09$	$2,23^{b} \pm 0,36$	$6,20^{b} \pm 0,37$	$301,58^{b} \pm 22,94$	$0,68^{b} \pm 0,05$
MPL5	$15,20^{b} \pm 1,35$	$2,84^{b} \pm 0,33$	$6,43^{b} \pm 0,57$	$287,94^{c} \pm 22,26$	$0,71^{b} \pm 0,08$
MPL7	$12,59^{a} \pm 2,81$	$3,60^{a} \pm 0,62$	$4,93^{a} \pm 0,46$	$316,74^{a} \pm 12,45$	$0,56^{a} \pm 0,07$

*Médias observadas em colunas com a mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p<0,05$).

A resistência à punctura (RP) é definida como a medida de dureza do filme quando este é submetido à uma força aplicada de forma perpendicular à sua superfície e a resistência à tração (RT) é a resistência máxima desempenhada pelo material quando este é submetido à tração (Sarantópoulos et al., 2002). Tanto para os resultados de punctura (RP) quanto para tração (RT), observa-se o aumento da medida de acordo com a adição de MPL exceto para a concentração máxima testada (MPL7). O tratamento MPL2 apresentou aumento de aproximadamente 35% na RP comparado ao biopolímero controle, e a mesma porcentagem foi verificada para a RT do tratamento MPL5. Esses resultados podem ser explicados justamente devido à uma boa interação entre os materiais utilizados: IPS, glicerol e MPL. Sugere-se que a presença de grupamentos -OH na matriz polimérica de IPS e glicerol podem se ligar à partes hidrofílicas da molécula de MPL criando uma forte energia de ligação entre a partícula e a matriz polimérica (El-Nemr, Mohamed, Ali, Fathy, & Dhmees, 2019; Sameni, Jaffer, & Sain, 2018). Além disso, com a utilização de uma partícula de lignina em tamanho reduzido (microescala) tem-se o aumento da área superficial específica disponível para interação com a matriz polimérica, o que acarreta o aumento de sua dispersibilidade e compatibilidade com o IPS, confirmado pela análise morfológica dos filmes (Sameni et al., 2018; Tian et al., 2017). Valores de RT semelhantes foram encontrados por Duval et al. (2013) ao estudarem o efeito da adição de lignina *kraft* em filmes de glúten como polímero base e glicerol como plastificante, variando de aproximadamente 3,5 a 4,5 Mpa.

A deformação (D) é caracterizada como a elasticidade que o filme apresenta quando submetido à força aplicada de forma perpendicular à sua superfície e o módulo de elasticidade (ME) ou módulo de Young é a razão entre a tensão de tração e a deformação na região linear da curva tensão-deformação (região elástica) do filme, sendo uma medida que expressa sua rigidez. A porcentagem de alongamento na ruptura (%ALR) mostra a capacidade do filme em esticar antes de seu rompimento durante a análise de tração. O resultado de D diminuiu e o de ME aumentou para os biopolímeros MPL2 e MPL5, caracterizando filmes menos elásticos (D) e mais rígidos (ME). Este último corroborando os resultados de RP e RT. MPL2 e MPL5 apresentaram diminuição de 22 e 39% na D, respectivamente, enquanto o aumento máximo no ME se deu para o MPL5 com 42% a mais de rigidez. Para os resultados de %ALR

observa-se o mesmo comportamento encontrado para a D, com diminuição de aproximadamente 5,6 e 10% para os tratamentos MPL2 e MPL5, respectivamente, indicando um menor alongamento do material antes da ruptura. Esse resultado, assim como o encontrado para D, demonstra que a adição de MPL aos filmes foi capaz de restringir a mobilidade das cadeias do polímero com aumento da sua rigidez, confirmado pelos resultados de RT, RP e ME (Reddy & Rhim, 2014). Núñez-Flores et al. 2013 encontraram resultados semelhantes a este estudo para filmes de proteína de peixe adicionados de lignina, com valores de %ALR de aproximadamente 316 a 362.

O comportamento observado para o tratamento MPL7 onde não houveram diferenças significativas de RP, D, RT, %ALR e ME com o filme C, pode ser explicado devido à dificuldade de dispersão das moléculas de MPL quando adicionadas em concentração elevada, com tendência de atração e aglomeração e consequente formação de uma matriz polimérica mais heterogênea, como comprovado pelos resultados morfológicos (Sameni et al., 2018).

Além disso, estudos relatam dificuldade em encontrar uma tendência de aumento ou diminuição das propriedades mecânicas de polímeros adicionados de partículas de lignina e concluem que o comportamento vai variar de acordo não só com o tipo de polímero base utilizado, mas também o tipo de lignina (tamanho, fonte e método de extração), metodologia de produção desses polímeros, solubilidade e características de reatividade entre a lignina e o polímero (Sameni et al., 2018).

3.6 Propriedades de barreira ao vapor de água

A adição de MPL aos filmes de IPS foi significativa ($p<0,05$) para o parâmetro de permeabilidade ao vapor de água conforme apresentado na Tabela 4.

Tabela 4 Permeabilidade ao vapor de água (PVA) de biopolímeros IPS controle (FC) e adicionados de 0,25 (MPL2), 0,50 (MPL5) e 0,75% (MPL7) de MPL

Filmes	PVA x 10^{-10} (g m^{-1} s^{-1} Pa^{-1})
FC	$2,61^{a} \pm 0,063$
MPL2	$2,29^{b} \pm 0,048$
MPL5	$2,19^{b} \pm 0,032$
MPL7	$2,53^{a} \pm 0,019$

* Médias observadas em colunas com a mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p<0,05$).

A propriedade de barreira ao vapor de água de filmes produzidos a partir de polímeros de base proteica, como o IPS, é considerada como uma limitação desse material devido à característica hidrofílica que essas proteínas apresentam. Estudos investigam a utilização de métodos que permitam a melhoria da estrutura desses polímeros e consequentemente de suas propriedades como a utilização de

plastificantes, reticulação, desenvolvimento de filmes compósitos e a inclusão de diferentes tipos de micro e nanopartículas (Calva-Estrada, Jiménez-Fernández, & Lugo-Cervantes, 2019).

A adição de MPL acarretou a diminuição da permeabilidade ao vapor de água dos filmes de IPS. Houve uma diminuição de aproximadamente 16 e 12% na permeabilidade ao vapor de água dos filmes MPL2 e MPL5, respectivamente. quando comparados a FC. Porém, para o filme MPL7 adicionado da maior concentração de MPL, não houve diferença significativa para este parâmetro.

A diminuição da permeabilidade também pode ser explicada pela boa dispersão da MPL na matriz polimérica de IPS, favorecendo a obstrução da passagem do vapor de água ou possível aumento do caminho a ser percorrido por ele, diminuindo sua difusão pelo filme (Dias et al., 2019). Outra possível explicação para a diminuição da permeabilidade ao vapor de água dos filmes adicionados de MPL se deve ao fato de essas partículas apresentarem característica hidrofóbica devido a seu esqueleto extenso e aromático, diminuindo a afinidade da molécula de água pelos filmes (Duval et al., 2013).

Os resultados encontrados para o filme MPL7 corroboram os obtidos para análise mecânica e confirmados pela análise morfolófica dos filmes por microscopia eletrônica, sendo explicados pela interferência da alta concentração de MPL na morfologia dos filmes, com maior atração e aglomeração entre as micropartículas ocasionado a formação de filmes menos coesos que pode ter contribuído para a passagem do vapor de água pela matriz (Crouvisier-Urion et al., 2016).

Duval et al. (2013) também encontraram diminuição da permeabilidade ao vapor de água de filmes de glúten de trigo adicionados de diferentes concentrações de lignina *kraft* relacionando a diminuição a natureza hidrofóbica da lignina *kraft*. Zadeh et al. (2018) também encontraram diminuição da permeabilidade ao vapor de água de filmes de ágar incorporados com diferentes concentrações de lignina relacionado o resultado à atuação da lignina como barreira à passagem do vapor de água pelo interior do filme.

3.7 Propriedades ópticas

As imagens dos filmes com diferentes concentrações de MPL e os resultados de *L**, *a**, *b**, *C** e transparência dos filmes estão apresentados na Figura 5 e Tabela 5, respectivamente.

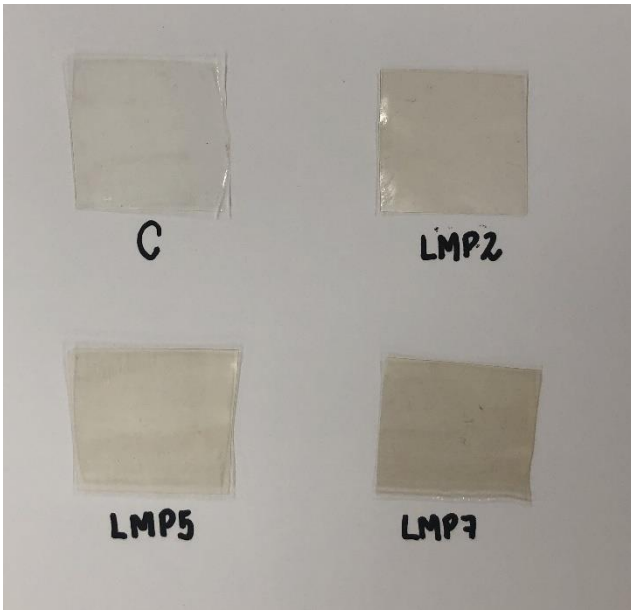


Figura 5 Imagem de biopolímeros de IPS controle (C) e adicionados de 0,25 (LMP2), 0,50 (LMP5) e 0,75% (LMP7) de MPL.

Tabela 5 Propriedades ópticas dos biopolímeros IPS controle (FC) e adicionados de 0,25 (MPL2), 0,50 (MPL5) e 0,75% (MPL7) de MPL

Filmes	L*	a*	b*	C*	h	T (%)
FC	$88,38^{a} \pm 0,42$	$-0,15^{a} \pm 0,05$	$-2,68^{a} \pm 0,31$	$3,61^{a} \pm 0,85$	$0,28^{a} \pm 0,02$	$7,63^{a} \pm 0,012$
MPL2	$88,23^{a} \pm 0,27$	$-0,24^{a} \pm 0,11$	$0,92^{b} \pm 0,53$	$0,45^{b} \pm 0,60$	$1,20^{b} \pm 0,14$	$8,34^{b} \pm 0,007$
MPL5	$85,65^{b} \pm 0,45$	$-0,50^{a} \pm 0,05$	$2,65^{c} \pm 0,35$	$3,65^{a} \pm 0,95$	$0,68^{a} \pm 0,06$	$9,37^{c} \pm 0,019$
MPL7	$83,20^{c} \pm 0,21$	$0,02^{b} \pm 0,10$	$4,40^{d} \pm 1,11$	$9,70^{c} \pm 5,22$	$3,51^{c} \pm 0,41$	$7,95^{a} \pm 0,006$

* Médias observadas em colunas com a mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p<0,05$).

Visualmente os filmes adicionados de MPL aparentaram-se mais amarronzados quando comparados ao filme controle, com aumento da intensidade da cor marrom de acordo com o aumento da concentração de MPL (Figura 5).

A luminosidade (L*) indica o grau de claridade da cor, ou seja, se a cor estudada é clara ou escura. Para o sistema CIE utilizado na medida desse parâmetro, a escala de luminosidade varia de 0 (preto puro) a 100 (branco puro). Para os tratamentos estudados, o valor de L* variou de 83,20 a 88,38, caracterizando filmes claros. Entre eles, os filmes C e MPL2 obtiveram os maiores valores de L* e, portanto, se apresentaram mais claros, quando comparados aos filmes MPL5 e MPL7, que se tornaram mais escuros a partir da adição das maiores concentrações de MPL.

Para os parâmetros de a* e b* temos que: valores de a positivos (+a) indicam o vermelho, a* negativo (-a) o verde, b* positivo (+b) indicam o amarelo e b* negativo (-b) o azul (Ramos & Gomide, 2017). Para os valores de a*, FC, MPL2 e MPL5 não apresentaram diferença significativa entre eles, com valores indicando coloração verde (negativo) e o tratamento MPL7 sendo o único com valor

positivo indicando uma coloração levemente avermelhada característica da MPL. Os valores de b* aumentaram progressivamente a partir da adição de MPL, sendo o filme controle o único com resultado negativo indicando uma coloração azulada enquanto os tratamentos com a micropartícula se tornaram cada vez mais intensos na coloração amarela (positivo).

O índice de saturação (C*) também pode ser chamado de intensidade da cor e é o parâmetro que nos permite distinguir cores fracas de fortes. Sendo assim, reduzidos valores de saturação nos permitem relacionar o objeto de estudo à palidez ou coloração acinzentada, enquanto aqueles com altos valores de saturação são denominados saturados (Ramos & Gomide, 2017). Os valores de saturação encontrados para os tratamentos FC, MPL2 e MPL5 caracterizaram filmes menos saturados, ou seja, mais pálidos que o tratamento MPL7, sendo confirmado visualmente pela Figura 5. Esses resultados já eram esperados e coincidem com resultados encontrados por outros autores (Iglesias Montes et al., 2019; Zadeh et al., 2018). Os resultados estão relacionados a cor típica da MPL e a sua dispersão pelos filmes.

O ângulo de tonalidade (*h**) indica a qualidade da cor (vermelho, verde, azul, etc) (Ramos & Gomide, 2017). O sólido de cor referente aos valores encontrados para *h** é dividido em quatro quadrantes e os valores encontrados mostram que os filmes saíram de uma coloração esverdeada para a cor vermelha com o aumento da concentração de MPL.

Para os resultados de transparência, os tratamentos FC e MPL7 apresentaram resultados semelhantes com menores valores, ou seja, mais opacos, enquanto os filmes MPL2 e MPL5 se tornaram mais transparentes. Esses resultados são promissores pois comprovam que a adição de MPL em concentrações reduzidas não foi suficiente para diminuir o valor de transparência quando comparado a FC, podendo ser explicados mais uma vez, pela boa dispersão das MPL pela matriz polimérica dos filmes MPL2 e MPL5 favorecendo uma maior homogeneidade e maior facilidade no deslocamento da luz. Para o tratamento MPL7, a aglomeração das MPL pode ter atuado como obstáculo à essa passagem explicando a diminuição da sua transparência.

3.8 Potencial antioxidante dos biopolímeros

A atividade antioxidante dos diferentes tratamentos de biopolímeros de IPS e MPL pelo método de redução do complexo fosfomolibdênio é apresentada na Figura 6. Os filmes incorporados com MPL (MPL2, MPL5 e MPL7) apresentaram aumento significativo da atividade antioxidante quando comparado ao filme controle (FC).

O método de redução do complexo fosfomolibdênio é uma maneira simples de avaliar a capacidade antioxidante total de uma amostra. A solução teste inicial possui coloração amarela tornando-se verde a medida que a solução de fosfato de molibdênio se reduz. O método tem a vantagem

de avaliar a capacidade antioxidante de componentes lipofílicos e hidrofílicos (Prieto, Pineda, & Aguilar, 1999).

O aumento da atividade antioxidante dos biopolímeros adicionados de MPL pode ser explicado devido à estrutura química da molécula de lignina sendo estudada por vários autores (Beisl, Friedl, & Miltner, 2017; Santos, Erdocia, Gatto, & Labidi, 2014; Weijun Yang et al., 2018). A presença de compostos fenólicos (grupamentos hidroxila), grupamentos orto-metoxi e hidroxilas alifáticas presentes na cadeia lateral da MPL parecem ser os principais contribuintes da eliminação e estabilização dos radicais livres pela MPL.

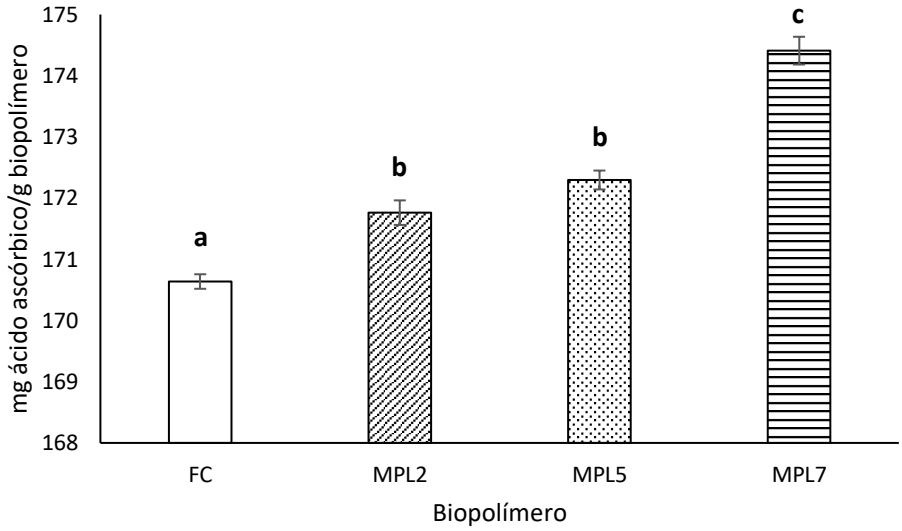


Figura 6 Atividade antioxidante pela redução do complexo fosfomolibdênio de biopolímeros de isolado proteico de soro de leite (IPS) controle (FC) e incorporados de 0,25 (MPL2), 0,50 (MPL5) e 0,75% (MPL7) de MPL. Médias observadas em barras com a mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p<0,05$).

4. Conclusão

A adição de MPL aos filmes de IPS não acarretou mudanças em sua estrutura e formação de novos tipos de ligações entre as moléculas de acordo com as análises de DRX e FTIR. Houve boa dispersão da MPL pela matriz polimérica dos filmes incorporados das concentrações 0,25 e 0,50% (p/p), com melhoria de sua estabilidade térmica, resistência e rigidez e barreira ao vapor de água. Esses filmes se apresentaram mais escuros, avermelhados e transparentes e com potencial antioxidante. Não houve boa dispersão da MPL para o filme com maior concentração (0,75% p/p), com formação de fissuras e pontos de aglomeração pela micrografia, resultando em prejuízo na melhoria de suas propriedades, apesar de apresentar o maior potencial antioxidante. Assim sendo, a adição de 0,25 e 0,50% (p/p) de MPL a biopolímeros de IPS resultaram em filmes com potencial de aplicação em alimentos por trazer

melhoria de suas propriedades e atividade antioxidante, contribuindo para o aumento da utilização desses dois polímeros biodegradáveis e renováveis e assim para o desenvolvimento sustentável.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Hilmar Ingredients pelo fornecimento do IPS9400 utilizado nos experimentos, à FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais), CNPq (Conselho Nacioanal de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo apoio financeiro e bolsas de estudo. Os autores gostariam de agradecer ao Laboratório de Microscopia Eletrôncia e Análise Estrutural (http://www.prp.ufla.br/labs/microscopiaeletronica/), da Universidade Federal de Lavras (UFLA), pelo fornecimento de equipamentos e suporte técnico para a análise envolvendo microscópio eletrônico. Os autores gostariam de agradecer à Central de Análise e Prospecção Química da UFLA pelo fornecimento de equipamentos e suporte técnico para as análises envolvendo FTIR.

Referências bibliográficas

Aadil, K. R., Prajapati, D., & Jha, H. (2016). Improvement of physcio-chemical and functional properties of alginate film by Acacia lignin. Food Packaging and Shelf Life, 10, 25–33. https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2016.09.002

Alzagameem, A., Klein, S. E., Bergs, M., Do, X. T., Korte, I., Dohlen, S., … Schulze, M. (2019). Antimicrobial activity of lignin and lignin-derived cellulose and chitosan composites against selected pathogenic and spoilage microorganisms. Polymers, 11(4). https://doi.org/10.3390/polym11040670

American Society for Testing and Materials. ASTM. (2002). Designación D 882: “Standard Test Method for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting”. 14, 1–10.

American Society for Testing and Materials. (2000). Astm D618. American Society for Testing and Materials, i, 7–10. https://doi.org/10.1520/D0618-13.2

ASTM. (2002). Standard Test Method for Slow Rate Penetration Resistance of Flexible Barrier Films. Astm F1306-90, 90(Reapproved), 1–6. https://doi.org/10.1520/F1306-90R08E01.2

ASTM D 3418 –99. (2004). Standard Test Method for Transition Temperatures of Polymers By Differential Scanning Calorimetry. Test, 08(July), 1–7.

ASTM International. (2005). Standard Test Methods for Water Vapor Transmission of Materials, E 96/E 96M - 05. i, 1–8.

Azevedo, Viviane M., Dias, M. V., Borges, S. V., Costa, A. L. R., Silva, E. K., Medeiros, ??ber Antonio A, & Soares, N. de F. F. (2015). Development of whey protein isolate bio-nanocomposites: Effect of montmorillonite and citric acid on structural, thermal, morphological and mechanical properties. Food Hydrocolloids, 48, 179–188. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.02.014

Azevedo, Viviane Machado, Silva, E. K., Gonçalves Pereira, C. F., da Costa, J. M. G., & Borges, S. V. (2015). Whey protein isolate biodegradable films: Influence of the citric acid and montmorillonite clay nanoparticles on the physical properties. Food Hydrocolloids, 43, 252–258. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.05.027

Beisl, S., Friedl, A., & Miltner, A. (2017). Lignin from micro- To nanosize: Applications. International Journal of Molecular Sciences, 18(11). https://doi.org/10.3390/ijms18112367

Calva-Estrada, S. J., Jiménez-Fernández, M., & Lugo-Cervantes, E. (2019). Protein-Based Films: Advances in the Development of Biomaterials Applicable to Food Packaging. Food Engineering Reviews, (2019), 78–92. https://doi.org/10.1007/s12393-019-09189-w

Crouvisier-Urion, K., Bodart, P. R., Winckler, P., Raya, J., Gougeon, R. D., Cayot, P., … Karbowiak, T. (2016). Biobased Composite Films from Chitosan and Lignin: Antioxidant Activity Related to Structure and Moisture. ACS Sustainable Chemistry and Engineering, 4(12), 6371–6381. https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.6b00956

Crouvisier-Urion, K., Regina da Silva Farias, F., Arunatat, S., Griffin, D., Gerometta, M., Rocca-Smith, J. R., … Karbowiak, T. (2019). Functionalization of chitosan with lignin to produce active materials by waste valorization. Green Chemistry, 21(17), 4633–4641. https://doi.org/10.1039/c9gc01372e

de Melo, P. G., Fornazier Borges, M., Afonso Ferreira, J., Vicente Barbosa Silva, M., & Ruggiero, R. (2018). Bio-based cellulose acetate films reinforced with lignin and glycerol. International Journal of Molecular Sciences, 19(4), 1–13. https://doi.org/10.3390/ijms19041143

Dias, M. V., Azevedo, V. M., Santos, T. A., Pola, C. C., Lara, B. R. B., Borges, S. V., … Sarantópoulous, C. (2019). Effect of active films incorporated with montmorillonite clay and α-tocopherol: Potential of nanoparticle migration and reduction of lipid oxidation in salmon. Packaging Technology and Science, 32(1), 39–47. https://doi.org/10.1002/pts.2415

Duval, A., Molina-Boisseau, S., & Chirat, C. (2013). Comparison of Kraft lignin and lignosulfonates addition to wheat gluten-based materials: Mechanical and thermal properties. Industrial Crops and Products, 49, 66–74. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.04.027

El-Nemr, K. F., Mohamed, H. R., Ali, M. A., Fathy, R. M., & Dhmees, A. S. (2019). Polyvinyl alcohol/gelatin irradiated blends filled by lignin as green filler for antimicrobial packaging materials. International Journal of Environmental Analytical Chemistry, 00(00), 1–25. https://doi.org/10.1080/03067319.2019.1657108

Espinosa, E., Bascón-Villegas, I., Rosal, A., Pérez-Rodríguez, F., Chinga-Carrasco, G., & Rodríguez, A. (2019). PVA/(ligno)nanocellulose biocomposite films. Effect of residual lignin content on structural, mechanical, barrier and antioxidant properties. International Journal of Biological Macromolecules, 141, 197–206. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.08.262

Galietta, G., Di Gioia, L., Guilbert, S., & Cuq, B. (1998). Mechanical and Thermomechanical Properties of Films Based on Whey Proteins as Affected by Plasticizer and Crosslinking Agents. Journal of Dairy Science, 81(12), 3123–3130. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(98)75877-1

Gilca, I. A., Popa, V. I., & Crestini, C. (2015). Obtaining lignin nanoparticles by sonication. Ultrasonics Sonochemistry, 23, 369–375. https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2014.08.021

Gökkaya Erdem, B., Dıblan, S., & Kaya, S. (2019). Development and structural assessment of whey protein isolate/sunflower seed oil biocomposite film. Food and Bioproducts Processing, 118, 270–280. https://doi.org/10.1016/j.fbp.2019.09.015

Hammam, A. R. A. (2019). Technological, applications, and characteristics of edible films and coatings: a review. SN Applied Sciences, 1(6), 1–11. https://doi.org/10.1007/s42452-019-0660-8

Hammann, F., & Schmid, M. (2014). Determination and quantification of molecular interactions in protein films: A review. Materials, 7(12), 7975–7996. https://doi.org/10.3390/ma7127975

He, X., Luzi, F., Hao, X., Yang, W., Torre, L., Xiao, Z., … Puglia, D. (2019). Thermal, antioxidant and swelling behaviour of transparent polyvinyl (alcohol) films in presence of hydrophobic citric acid-modified lignin nanoparticles. International Journal of Biological Macromolecules, 127, 665–676. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.01.202

Iglesias Montes, M. L., Luzi, F., Dominici, F., Torre, L., Cyras, V. P., Manfredi, L. B., & Puglia, D. (2019). Design and characterization of PLA bilayer films containing lignin and cellulose nanostructures in combination with umbelliferone as active ingredient. Frontiers in Chemistry, 7(MAR), 1–13. https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00157

Julinová, M., Slavík, R., Vyoralová, M., Kalendová, A., & Alexy, P. (2018). Utilization of Waste Lignin and Hydrolysate From Chromium Tanned Waste in Blends of Hot-Melt Extruded PVA-Starch. Journal of Polymers and the Environment, 26(4), 1459–1472. https://doi.org/10.1007/s10924-017-1050-1

Klanwan, Y., Kunanopparat, T., Menut, P., & Siriwattanayotin, S. (2016). Valorization of industrial by-products through bioplastic production: Defatted rice bran and kraft lignin utilization. Journal of Polymer Engineering, 36(5), 529–536. https://doi.org/10.1515/polyeng-2015-0301

Kovalcik, A., Machovsky, M., Kozakova, Z., & Koller, M. (2015). Designing packaging materials with viscoelastic and gas barrier properties by optimized processing of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) with lignin. Reactive and Functional Polymers, 94, 25–34. https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2015.07.001

Laurichesse, S., & Avérous, L. (2014). Chemical modification of lignins: Towards biobased polymers. Progress in Polymer Science, 39(7), 1266–1290. https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2013.11.004

Le Tien, C., Letendre, M., Ispas-Szabo, P., Mateescu, M. A., Delmas-Patterson, G., Yu, H. L., & Lacroix, M. (2000). Development of biodegradable films from whey proteins by cross-linking and entrapment in cellulose. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48(11), 5566–5575. https://doi.org/10.1021/jf0002241

Naik, P., Rozman, H. D., & Bhat, R. (2013). Genoprotective effects of lignin isolated from oil palm black liquor waste. Environmental Toxicology and Pharmacology, 36(1), 135–141. https://doi.org/10.1016/j.etap.2013.03.004

Núñez-Flores, R., Giménez, B., Fernández-Martín, F., López-Caballero, M. E., Montero, M. P., & Gómez-Guillén, M. C. (2013). Physical and functional characterization of active fish gelatin films incorporated with lignin. Food Hydrocolloids, 30(1), 163–172. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.05.017

Prieto, P., Pineda, M., & Aguilar, M. (1999). Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a …. Analytical Biochemistry, 269, 337–341. https://doi.org/10.1037/a0037168

Ramos, ??scar L., Reinas, I., Silva, S. I., Fernandes, J. C., Cerqueira, M. A., Pereira, R. N., … Malcata, F. X. (2013). Effect of whey protein purity and glycerol content upon physical properties of edible films manufactured therefrom. Food Hydrocolloids, 30(1), 110–122. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.05.001

Reddy, J. P., & Rhim, J. W. (2014). Characterization of bionanocomposite films prepared with agar and paper-mulberry pulp nanocellulose. Carbohydrate Polymers, 110, 480–488. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.04.056

Sameni, J., Jaffer, S. A., & Sain, M. (2018). Thermal and mechanical properties of soda lignin/HDPE blends. Composites Part A: Applied Science and Manufacturing, 115(June), 104–111. https://doi.org/10.1016/j.compositesa.2018.09.016

Santos, P. S. B. do., Erdocia, X., Gatto, D. A., & Labidi, J. (2014). Characterisation of Kraft lignin separated by gradient acid precipitation. Industrial Crops and Products, 55, 149–154. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.01.023

Segal, L., Creely, J. J., Martin, A. E., & Conrad, C. M. (1959). An Empirical Method for Estimating the Degree of Crystallinity of Native Cellulose Using the X-Ray Diffractometer. Textile Research Journal, 29(10), 786–794. https://doi.org/10.1177/004051755902901003

Shankar, S., Reddy, J. P., & Rhim, J. W. (2015). Effect of lignin on water vapor barrier, mechanical, and structural properties of agar/lignin composite films. International Journal of Biological Macromolecules, 81, 267–273. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.08.015

Shankar, S., & Rhim, J. W. (2017). Preparation and characterization of agar/lignin/silver nanoparticles composite films with ultraviolet light barrier and antibacterial properties. Food Hydrocolloids, 71, 76–84. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.05.002

Tavares, L. B., Ito, N. M., Salvadori, M. C., dos Santos, D. J., & Rosa, D. S. (2018). PBAT/kraft lignin blend in flexible laminated food packaging: Peeling resistance and thermal degradability. Polymer Testing, 67(November 2017), 169–176. https://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2018.03.004

Tem-, C., & Calorimeters, S. (1999). Standard Test Method for Enthalpies of Fusion and Crystallization of Polymers by Differential Scanning Calorimetry (DSC) 1. Current, 14, 11–14. https://doi.org/10.1520/E0793-06.2

Tian, D., Hu, J., Bao, J., Chandra, R. P., Saddler, J. N., & Lu, C. (2017). Lignin valorization: Lignin nanoparticles as high-value bio-additive for multifunctional nanocomposites. Biotechnology for Biofuels, 10(1), 1–11. https://doi.org/10.1186/s13068-017-0876-z

Xing, Q., Buono, P., Ruch, D., Dubois, P., Wu, L., & Wang, W. J. (2019). Biodegradable UV-Blocking Films through Core-Shell Lignin-Melanin Nanoparticles in Poly(butylene adipate- co-terephthalate) [Research-article]. ACS Sustainable Chemistry and Engineering, 7(4), 4147–4157. https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.8b05755

Yang, H., Yan, R., Chen, H., Lee, D. H., & Zheng, C. (2007). Characteristics of hemicellulose, cellulose and lignin pyrolysis. Fuel, 86(12–13), 1781–1788. https://doi.org/10.1016/j.fuel.2006.12.013

Yang, W., Fortunati, E., Bertoglio, F., Owczarek, J. S., Bruni, G., Kozanecki, M., … Puglia, D. (2018a). Polyvinyl alcohol/chitosan hydrogels with enhanced antioxidant and antibacterial properties induced by lignin nanoparticles. Carbohydrate Polymers, 181(October 2017), 275–284. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.10.084

Yang, W., Fortunati, E., Bertoglio, F., Owczarek, J. S., Bruni, G., Kozanecki, M., … Puglia, D. (2018b). Polyvinyl alcohol/chitosan hydrogels with enhanced antioxidant and antibacterial properties induced by lignin nanoparticles. Carbohydrate Polymers, 181(August 2017), 275–284. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.10.084

Yang, W., Owczarek, J. S., Fortunati, E., Kozanecki, M., Mazzaglia, A., Balestra, G. M., … Puglia, D. (2016). Antioxidant and antibacterial lignin nanoparticles in polyvinyl alcohol/chitosan films for active packaging. Industrial Crops and Products, 94(January), 800–811. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.09.061

Yang, Weijun, Fortunati, E., Gao, D., Balestra, G. M., Giovanale, G., He, X., … Puglia, D. (2018). Valorization of Acid Isolated High Yield Lignin Nanoparticles as Innovative Antioxidant/Antimicrobial

Organic Materials. ACS Sustainable Chemistry and Engineering, 6(3), 3502–3514. https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.7b03782

Yang, Weijun, Kenny, J. M., & Puglia, D. (2015). Structure and properties of biodegradable wheat gluten bionanocomposites containing lignin nanoparticles. Industrial Crops and Products, 74, 348–356. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.05.032

Zadeh, E. M., O'Keefe, S. F., & Kim, Y. T. (2018). Utilization of Lignin in Biopolymeric Packaging Films [Research-article]. ACS Omega, 3(7), 7388–7398. https://doi.org/10.1021/acsomega.7b01341

ARTIGO 3

ESTUDO DA APLICAÇÃO DE BIOPOLÍMEROS ATIVOS DE IPS E MICROPARTÍCULA DE LIGNINA NO CONTROLE DA OXIDAÇÃO LIPÍDICA DE CARNE MOÍDA

(VERSÃO PRELIMINAR)

Artigo redigido conforme normas da revista Meat Science

Resumo

Neste trabalho, estudou-se a atividade antioxidante de biopolímeros de isolado proteico de soro de leite (IPS) e diferentes concentrações de MPL (0; 0,25; 0,50 e 0,75% p/p) pelas análises de sequestro de radicais livres DPPH e sistema β-caroteno/ácido linoleico, e avaliado o efeito desses filmes ativos sobre a prevenção da oxidação de carne moída (*Biceps femoris*) pela análise de identificação de compostos voláteis por CG-MS, índice de TBARS, formas redox da mioglobina e cor objetiva (*L*, a*, b*, C* e h**) pelo período de 4 dias de armazenamento a 4°C ± 1°C. A atividade antioxidante (%) dos filmes ativos apresentou aumento linear de acordo com a concentração de MPL pelos dois testes antioxidantes. Pela análise de identificação de compostos voláteis por CG-MS o acondicionamento pelos biopolímeros ocasionou redução significativa ($p<0,05$) nas áreas dos picos relativos aos compostos hexanal, heptanal, octanal e nonanal nos tempos de armazenamento. Houve redução ($p<0,05$) nos valores de TBARS a partir do tempo 1 (24 horas) para os tratamentos contendo MPL, e essa adição também foi capaz de manter o índice em valores baixos e próximos de 1,0 durante todo o tempo avaliado, o que não aconteceu para os tratamentos controle (C e FC). As formas redox da mioglobina (OMb e MMb) não apresentaram diferença entre os tratamentos e pela análise de cor objetiva, apenas o tratamento C apresentou valores de *a** e *C** maiores. Sugere-se que a utilização de concentrações reduzidas de MPL (0,50% p/p) em filmes de IPS seja suficiente para fornecer propriedade antioxidante a esse material permitindo sua utilização no controle da oxidação lipídica de carne moída pelo período e condições estudadas.

Palavras-chave: embalagem ativa; índice de TBARS; compostos voláteis; carne bovina; hexanal.

1 Introdução

A grande maioria das embalagens de alimentos utilizadas hoje em dia são produzidas a partir de polímeros derivados do petróleo e representam uma grande ameaça ao meio ambiente por serem derivadas de uma fonte não renovável e consideradas como não biodegradáveis. Por isso, filmes biodegradáveis derivados de fontes renováveis representam uma alternativa interessante aos materiais plásticos convencionais (Mohammad Zadeh, O'Keefe, & Kim, 2019; Sun et al., 2019). O isolado proteico de soro de leite (IPS) é um coproduto da indústria de queijos e caseína, renovável, biodegradável, biocompatível e não tóxico, com excelente capacidade de formar filmes, e características interessantes como transparência e boa barreira à gases, sendo assim bastante estudado. Essas características fazem com que o IPS seja um polímero biodegradável interessante a ser utilizado na formação de filmes a serem aplicados em alimentos (Azevedo et al., 2019; Carvalho et al., 2019; Lara et al., 2019). A adição de outros polímeros ou materiais com propriedades antioxidantes aos filmes de IPS também vem sendo estudada com o intuito de se desenvolver embalagens de alimentos biodegradáveis e ativas, que possam atuar no aumento da vida útil do alimento acondicionado

contribuindo assim para sua segurança alimentar e ainda permitir maior valor agregado a esse material (Azevedo et al., 2019; Carvalho et al., 2019; López-Hernández et al., 2018).

A utilização de lignina como um segundo polímero ou na forma de micro ou nanopartícula é interessante e vem sendo estudada com o objetivo de incorporar propriedade antioxidante a algumas matrizes poliméricas como: poliuretano, quitosana, celulose, isolado proteico de soja, álcool polivinílico, polipropileno dentre outros (Chen, Ye, Gu, & Zhou, 2018; Guo et al., 2019; He et al., 2019; Klein, Rumpf, Alzagameem, Rehahn, & Schulze, 2019; Mohammad Zadeh et al., 2019; Sun et al., 2019). Estudos sobre o desenvolvimento de filmes de IPS e lignina ainda não estão disponíveis na literatura. A lignina é o polifenol mais abundante na natureza apresentando diversos grupos funcionais como hidroxilas alifáticas e aromáticas, carbonilas e carboxilas. Sua estrutura química, tipos e números de ligações variam de acordo com sua fonte e método de extração (He et al., 2019). Dentre as vantagens da utilização da lignina como antioxidante estão: é natural, biodegradável, obtida como um coproduto da indústria de papel e celulose apresentando baixo custo e boa disponibilidade e derivada de fonte renovável (Chen et al., 2018). A utilização de um material natural se torna ainda mais interessante visto que os consumidores estão cada vez mais preocupados com a possível influência negativa de antioxidantes sintéticos sob sua saúde (Amiri et al., 2019).

O consumo de carne e derivados vem crescendo ao longo dos anos e movimentando o setor financeiro dos países que exportam e importam esse alimento. Devido a seu alto conteúdo em nutrientes, as carnes estão expostas não só a contaminação e deterioração microbiológica, mas também a oxidação lipídica e proteica. A carne moída foi escolhida pois é uma matriz que sofre mais rapidamente a oxidação devido ao processo de moagem que expõe a superfície muscular aos catalisadores da oxidação (O_2) além de liberar ácidos graxos poli-insaturados dos fosfolipídeos da parede celular e ferro dos pigmentos aumentando sua susceptibilidade à oxidação. Na presença de oxigênio, radicais livres como por exemplo os radicais hidroxila, abstraem um hidrogênio de ácidos graxos insaturados, levando a formação de compostos de sabor e aroma indesejáveis na carne (Alnoumani, Ataman, & Were, 2017). A oxidação lipídica limita a vida útil desses alimentos com mudanças em suas características sensoriais como perda de sabor, cor e textura e em sua qualidade nutricional pela formação de radicais livres que podem ser prejudiciais à saúde humana (Amiri, Aminzare, Azar, & Mehrasbi, 2019; Zhou, Xu, & Liu, 2010).

Sendo assim, o objetivo deste estudo foi de avaliar o potencial antioxidante dos biopolímeros de IPS com diferentes concentrações de micropartícula de lignina *kraft* (MPL) e aplicar os biopolímeros ativos em carne bovina moída mantidas sob temperatura de refrigeração (4°C ± 1°C) avaliando seu efeito na prevenção da oxidação lipídica.

2 Material e Métodos

2.1 Material

Isolado proteico de soro de leite - IPS9400/ *Hilmar Ingredients* (Hilmar, CA, EUA), lignina *kraft* para a produção da micropartícula de lignina (MPL) cedida pelo Laboratório de Produtos Bioativos e Soluções Tecnológicas da Universidade Federal de Viçosa (Campus Rio Paranaíba), glicerol, metanol, DPPH, β-caroteno, ácido linoleico, clorofórmio, Tween20®, ácido tricloroacético, ácido tiobarbitúrico e ácido ácetico glacial (*Sigma-Aldrich*, St. Louis, MO, EUA). Cortes de coxão duro (*Biceps femoris*) foram obtidos em açougue local na cidade de Lavras (Minas Gerais, Brasil).

2.2 Desenvolvimento da MPL e produção dos biopolímeros

As MPL foram desenvolvidas de acordo com Alvarenga et al. (2020) e os filmes pelo método de secagem de solvente (*casting)* de acordo com Azevedo et al. (2015). IPS e glicerol foram fixados nas quantidades de 6% (p/v) em relação ao volume de solução e 30% (p/p) em relação ao polímero base. Para a produção do filme FC (controle), IPS foi dissolvido separadamente em água destilada assim como o glicerol e mantidos sob agitação durante 30 minutos. Depois disso, as duas soluções foram misturadas e agitadas novamente por 10 minutos, o pH foi corrigido para 8,0 com solução de NaOH 1N e a solução foi agitada em homogeneizador ultrassônico para dispersão das nanopartículas (*Sonifier Cell Disruptor Branson* – Modelo 450D, Manchester, UK) por 10 minutos com amplitude de 80% a 25°C. Posteriormente, as soluções foram levadas a banho-maria a 90°C por 30 minutos, resfriadas e vertidas em placas de vidro com dimensões de 18 x 30 cm. As soluções permaneceram por 48 horas nas placas até que o solvente fosse evaporado, com formação dos filmes. O volume final para cada solução vertida foi de 150mL. As MPL quando adicionadas, foram incorporadas à solução de glicerol para agitação.

2.3 Potencial antioxidante dos biopolímeros

Para a realização da análise de sequestro de radicais livres DPPH$^{\bullet}$ e sistema β-caroteno/ácido linoleico foi utilizado o extrato dos biopolímeros de acordo com metodologia proposta por Yang et al. (2018) com algumas modificações. 0,1g de filme foi pesada e cortada em pequenos pedaços, adicionado de 3mL de metanol 80% e mantido sob agitação constante durante 3 horas em temperatura ambiente (25°C ± 2°C) e ao abrigo de luz. Após esse período os extratos estavam prontos para serem analisados.

2.3.1 Sequestro de radicais livres DPPH$^{\bullet}$

A avaliação da atividade antioxidante por meio do sequestro de radicais livres 2,2-difenil-1-picril-hidrazila-DPPH•, dos biopolímeros de IPS incorporados de diferentes concentrações de MPL foi realizada de acordo com a metodologia de Yang et al. (2018) e Crouvisier-Urion et al. (2016) com algumas modificações. A atividade antioxidante dos filmes foi medida ao longo do tempo (até 24 horas) com objetivo de se observar o comportamento antioxidante da MPL no decorrer das horas. 1mL sobrenadante obtido na etapa de preparo dos extratos foi misturado a 1mL de solução metanólica de DPPH (50 mg L^{-1}) resultando em uma concentração final de 25 mg L^{-1} de DPPH. A mistura foi mantida ao abrigo de luz e temperatura ambiente por 24 horas. A absorbância das amostras foi medida a 517nm em espectrofotômetro Bel SPECTRO S-2000 (Monza, Itália) nos tempos de 30 minutos, 1, 2, 3, 6 e 24 horas. Solução de DPPH e metanol foi utilizada como controle e a atividade de sequestro de radicais livres DPPH (RSA) foi calculada utilizando a Equação 1.

$$(\text{RSA}, \%) = \left[\frac{A_{controle} - A_{amostra}}{A_{controle}}\right] * 100 \qquad (1)$$

Onde $A_{amostra}$ foi o valor de absorbância da encontrado para a amostra e $A_{controle}$ a absorbância do controle.

2.3.2 Sistema β-caroteno/ácido linoleico

A avaliação da atividade antioxidante por meio do sistema β-caroteno/ácido linoleico foi realizada de acordo com a metodologia de Phoopuritham et al. (2012) com algumas modificações. 10mg de β-caroteno foi dissolvido em 10mL de clorofórmio e 0,4mL dessa solução foi pipetada em 40µL de ácido linoleico e 400mg de Tween20®. O clorofórmio foi evaporado da solução e 100mL de água destilada saturada com oxigênio (30 minutos sob oxigenação) foram adicionados de forma lenta sobre a mistura com agitação constante (Emulsão A). Em seguida, 2mL da Emulsão A foram adicionados a 2mL do sobrenadante obtido na etapa de extração. Paralelamente, foram preparadas duas soluções, uma sem o antioxidante (controle) e outra com os mesmos reagentes da Emulsão A, sem o β-caroteno (Emulsão B). As leituras das amostras foram realizadas em espectrofotômetro Bel SPECTRO S-2000 (Monza, Itália) a 470nm nos tempos 0 e após 60 minutos em banho maria a 50°C. A porcentagem de atividade antioxidante (%AA) foi calculada de acordo com a Equação 2.

$$(\%\ \text{AA}) = \left[1 - \frac{(A_0 - A_t)}{(A°_0 - A°_t)}\right] \qquad (2)$$

Onde A_0 e $A°_0$ são as absorbâncias medidas no tempo 0 de incubação para as amostras e controle, respectivamente, e A_t e $A°_t$ são as absorbâncias medidas após 60 minutos de incubação para as amostras e controle, respectivamente.

2.4 Preparo da carne moída e acondicionamento

Cortes de coxão duro (*Biceps femoris*) foram obtidos em açougue local no dia do preparo. A carne foi cortada em pedaços menores e moída em moedor de carnes elétrico (BECCARO® modelo Picador PB-22, Brasil), utilizando-se uma placa com orifícios de 8mm de diâmetro. A carne moída foi dividida em cinco porções iguais, correspondentes aos 5 tratamentos: amostra controle (C), filme controle (FC), e filmes ativos com 0,25 (MPL2); 0,50 (MPL5) e 0,75% (MPL7) (p/p) de MPL. Em seguida, cerca de 60g de carne moída foram pesadas e dimensionadas sob pressão em forma de hambúrguer com o uso de formas plásticas de 10cm de diâmetro. As amostras foram colocadas em bandejas de poliestireno, cobertas superficialmente pelos nanobiopolímeros e embalados com filmes comerciais de cloreto de polivinila (PVC). A carne embalada foi acondicionada em câmara climática tipo BOD (modelo EL202, EletroLab, Brasil), à temperatura controlada de 4°C ± 1°C, sendo submetidas a fotoperíodo de 12 horas (luz/escuro). As análises de oxidação lipídica e cor foram realizadas nos tempos 0; 1; 2; 3 e 4 dias.

2.5 Avaliação da oxidação lipídica

A oxidação lipídica das amostras de carne moída foi analisada pelo índice de TBARS e foi realizada segundo metodologia descrita por Raharjo et al. (1992), com algumas modificações. Foram pesados 5g de amostra e adicionados de 20mL de solução de ácido tricloroacético a 5% (TCA), sendo a mistura triturada em homogeneizador Politron até se obter um líquido homogêneo (5 minutos). Em seguida, a solução foi filtrada em papel filtro. Alíquotas de 2mL foram retiradas e transferidas para tubos de ensaio contendo 2mL de solução de ácido tiobarbitúrico 0,08 M (TBA, diluído em ácido acético glacial 50%). Os tubos foram colocados em banho-maria a 100°C durante 10 minutos e em seguida, resfriados à temperatura ambiente, sendo submetidos à leitura da absorvância em espectrofotômetro SP 2000UV (BEL Photonics) a 532nm. Os valores foram expressos em miligrama de malonaldeído (MDA) por kilograma de amostra (mg de MDA/kg) multiplicando o valor da absorvância lida por 3,69 (valor de correção para as leituras das absorvâncias).

2.6 Análise de compostos voláteis

A separação e identificação dos compostos voláteis foi conduzida em um cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massas (GC-MS QP2010 Plus, Shimadzu, Japan), equipado com injetor automático para líquidos e gases (AOC-5000; Shimadzu, Japan) e uma coluna SLBTM (5% phenyl-95% dimethylsiloxane; 30m × 0.25mm × 0.25μm), segundo modificações do procedimento descrito por Kim et al. (2008). Cerca de 2,5 g da amostra foi pesada em uma vial de 22 mL e selado com um septo

de silicone/PTFE. Os compostos orgânicos voláteis foram extraídos em headspace por microextração em fase sólida (SPME), utilizando-se uma fibra DVB/CAR/PDMS (Divinylbenzene, Carboxen e Polydimethylsiloxane, 1 cm, 50-30μm de espessura de filme; marca Supelco). Antes da extração dos voláteis, a fibra foi limpa a 250°C por 5 minutos para prevenir possíveis contaminações. As amostras foram pré-aquecidas por 10 minuto a 60°C em bloco de aquecimento, e em seguida, a fibra SPME foi exposta por 45 minutos no vial para a extração dos compostos. A fibra foi então, injetada no CG, onde permaneceu por 5 minutos para a dessorção. A temperatura do injetor foi mantida à 250°C e operado no modo splitless. O gás de arraste utilizado foi Hélio 5.0 com um fluxo de 1,00 $mLmin^{-1}$. A temperatura do forno foi programada de 35°C (mantida por 2 minutos), à 80°C com taxa de 2 °C/min, de 80° a 150°C a uma taxa de 4°C/min e de 150° à 230°C à uma taxa de 8°C/min. O espectrômetro de massas utilizado foi o de impacto de elétrons (70 eV) utilizando o modo scan (45 a 350Da) com um corte de solvente em 0,55 min. A temperatura da interface do detector e da fonte de íons permaneceu a 250°C e 200°C, respectivamente. Os compostos voláteis foram identificados comparando os espectros de massas obtidos com espectros de massas fornecidos pelo banco de dados do software (Wiley 8 e FFNSC 1.2) e os índices de retenção obtidos experimentalmente comparados a dados reportados na literatura, por meio da injeção de uma série homológa de alcanos.

2.7 Formas redox da mioglobina e análise de cor objetiva

As formas redox da mioglobina e avaliação objetiva da cor das carnes foi realizada com o uso de um colorímetro espectrofotométrico modelo CM-700 (Kônica Minolta, Japão) com porta de abertura de 8 mm, iluminante A, ângulo de 10° para o observador e luz especular incluído SCI e excluído SCE. 5 leituras de cor foram realizadas em pontos distintos na superfície das carnes após remoção dos filmes. Foram registrados os dados de reflectância de 400 a 710nm em intervalos de 10nm.

O conteúdo relativo dos pigmentos heme (OMb, DMb e MMb) foram estimados pelo método matemático de Krzywicki (1979) e os índices de cor: luminosidade (L^*), índice de vermelho (a^*) e índice de amarelo (b^*) índices de saturação (C^*) e ângulo de tonalidade (h; em graus) foram obtidos pelo colorímetro.

As amostras também foram fotografadas utilizando câmara Photosimile 100 Studio (Ortery, Irvine, CA, USA) com quatro lâmpadas verticais (Philips Ecotone PL-L 865/4p; 18 W, 6500 K, 1200 lm E 80 Ra) em cada canto.

2.8 Análise estatística

Os filmes testados foram produzidos utilizando um delineamento inteiramente casualisado (DIC), onde as concentrações de MPL variaram de 0 (FC); 0,25 (MPL2); 0,50 (MPL5) e 0,75% (MPL7) (p/p). Para a avaliação do efeito antioxidante dos filmes em carne moída, o experimento também foi conduzido em um delineamento inteiramente casualizado (DIC), em esquema fatorial 5 x 5, sendo quatro biopolímeros (FC, MPL2, MPL5 e MPL7) mais a amostra de carne controle (C, sem o acondicionamento pelo biopolímero), e cinco tempos de armazenamento (0, 1, 2, 3 e 4 dias), armazenados a 4°C ± 1°C. O experimento foi conduzido em três repetições.

A análise estatística foi realizada utilizando o programa SAS® (Statistical Analysis System – SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA) em um nível de significância de 5%. Os principais efeitos e sua interação sobre os indicadores estudados foram determinados por análise de variância (ANOVA), e quando necessário, as médias foram analisadas pelo teste de Tukey. O experimento foi conduzido em três repetições.

3 Resultados e discussão

3.1 Potencial antioxidante dos biopolímeros

A atividade antioxidante dos diferentes tratamentos de biopolímeros de IPS e MPL pelos métodos de sequestro de radicais livres DPPH$^{\bullet}$ e sistema β-caroteno/ácido linoleico são mostradas nas Figuras 1 e 2. Os filmes incorporados com MPL (MPL2, MPL5 e MPL7) apresentaram aumento da atividade antioxidante quando comparado ao filme controle (FC) para as duas metodologias.

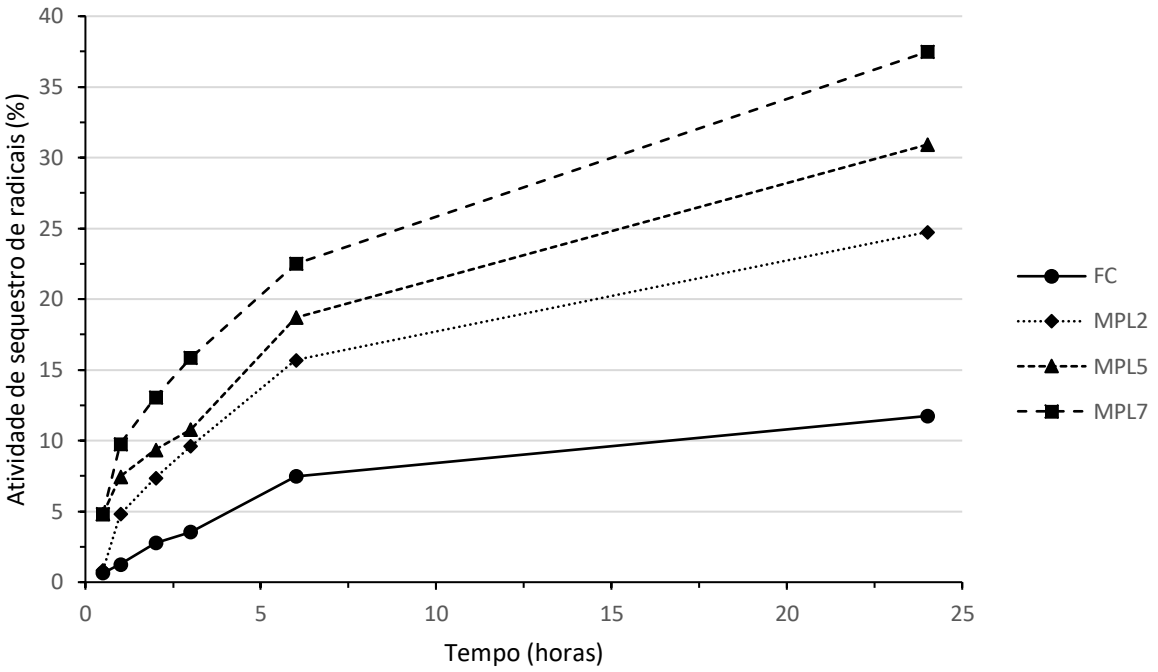


Figura 1 Atividade de sequestro de radicais livres DPPH• dos biopolímeros de IPS controle FC e adicionados de 0,25 (MPL2), 0,50 (MPL5) e 0,75% (MPL7) de MPL.

O método de sequestro de radicais livres DPPH• se baseia na redução das moléculas desses radicais os tornando estáveis a partir da presença de compostos fenólicos.

O aumento da atividade antioxidante dos biopolímeros adicionados de MPL pode ser explicado devido à estrutura química da molécula de lignina sendo estudada por vários autores (Beisl, Friedl, & Miltner, 2017; Santos, Erdocia, Gatto, & Labidi, 2014; Weijun Yang et al., 2018). Cada monômero de lignina – álcool ρ-cumarílico, álcool coniferílico e álcool sinapílico – é composto por dois grupamentos hidroxila (-OH) que podem estar disponíveis para a doação de elétrons ao radical livre DPPH•. Além disso, o extrato utilizado na análise foi preparado com utilização de metanol e água, essa última favorecendo a solubilidade do IPS e migração das moléculas ativas de MPL do interior dos filmes para a solução, permitindo sua atuação no sequestro de radicais livres. O fato das partículas de lignina apresentarem tamanho reduzido (micro) e portanto menor peso molecular também favorecem sua mobilidade pelo filme (Crouvisier-Urion et al., 2016; Gilca et al., 2015).

O aumento mais significativo no sequestro de radicais livres observado nas primeiras 6 horas, mas com manutenção do acréscimo até o período final analisado (24 horas) sem que um platô de atividade fosse observado é interessante quando se pensa na aplicação desses filmes em alimentos, visto que a MPL pode vir a atuar de forma mais prolongada mesmo quando liberada do filme para a matriz alimentícia, atuando na diminuição da oxidação do produto a longo prazo.

Ainda, a atividade antioxidante observada no filme controle (FC) (até 11,7%) podem estar relacionados a presença de aminoácidos com ação antioxidante nas proteínas presentes no IPS (ex: β-lactoglobulina e α-lactoalbumina) como triptofano, prolina, histidina e tirosina que podem atuar eliminando ou impedindo a formação de radicais livres seja pela doação de elétrons e/ou prótons ou ainda pela presença de grupamentos sulfidrilas (Anderson & Moore, 2004; de Souza et al., 2019; Mohanty, Mohapatra, Misra, & Sahu, 2016). Nos filmes contendo 0,75% (p/p) de MPL (MPL7), a atividade antioxidante aumentou mais de 3 vezes em relação à amostra controle.

Yang et al. (2016) também encontraram aumento da atividade antioxidante por meio da análise de sequestro de radicais livres de filmes de PVA e quitosana incorporados com 1 e 3% de nanopartículas de lignina. Os autores encontraram um aumento do sequestro de radicais livres de 4,5 vezes para os filmes adicionados da maior concentração quando comparados ao controle. Crouvisier-Urion et al. (2016) também encontraram o aumento da atividade de sequestro de radicais livres de filmes de quitosana incorporados com 10, 20 e 30% de lignina comparados ao controle, com atividade de sequestro de radicais de até 60%.

O extrato dos filmes contendo MPL também foi capaz de inibir a oxidação da emulsão de β-caroteno/ácido linoleico para todas as concentrações testadas (Figura 2).

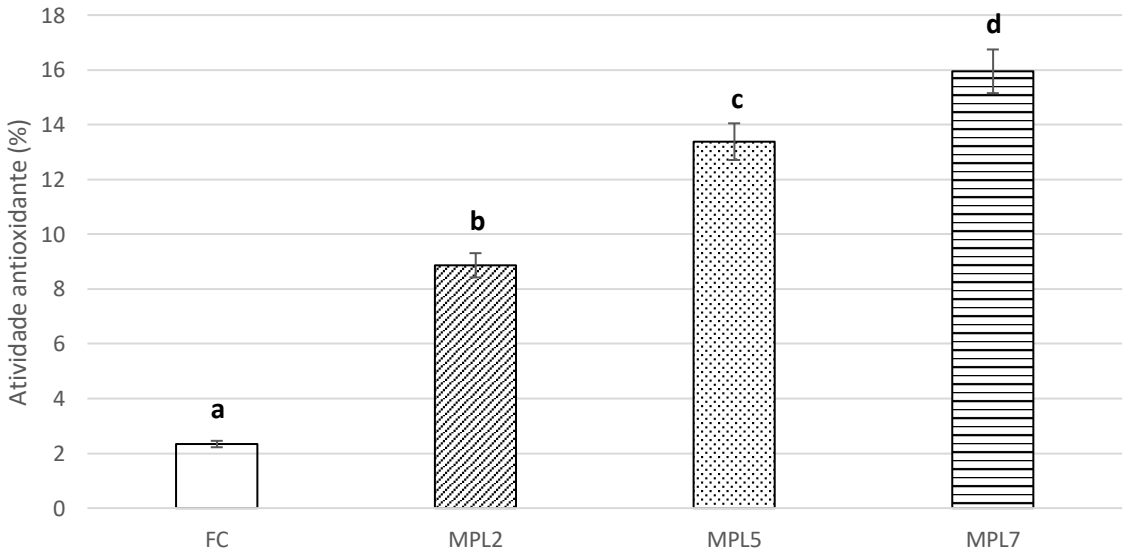


Figura 2 Atividade antioxidante (%) pelo sistema β-caroteno/ácido linoleico de biopolímeros de IPS controle FC e adicionados de 0,25 (MPL2), 0,50 (MPL5) e 0,75% (MPL7) de MPL. Médias observadas em barras com a mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p<0,05$).

A inibição da oxidação do sistema β-caroteno/ácido linoleico observada também pode estar relacionada a presença dos grupamentos hidroxila (OH) nas moléculas de MPL que vão atuar na neutralização dos radicais livres formados durante a peroxidação do ácido linoleico, protegendo o β-

caroteno da oxidação. A neutralização reduz a degradação do β-caroteno que é responsável pelo branqueamento da emulsão inicialmente laranja e assim, a presença de antioxidantes mantém a cor inicial do sistema (Elzaawely, Maswada, El-Sayed, & Ahmed, 2017). Toh et al. (2010) também encontraram redução da peroxidação do ácido linoleico ao analisarem extratos de lignina de folhas de chá verde e relacionam sua atividade antioxidante à atuação de grupamentos metoxilas localizados na posição orto de grupos hidroxila na estabilização dos radicais.

3.2 Avaliação da oxidação lipídica

Verificou-se que houve interação significativa ($p<0,05$) entre os tratamentos e o tempo de armazenamento (Figura 4).

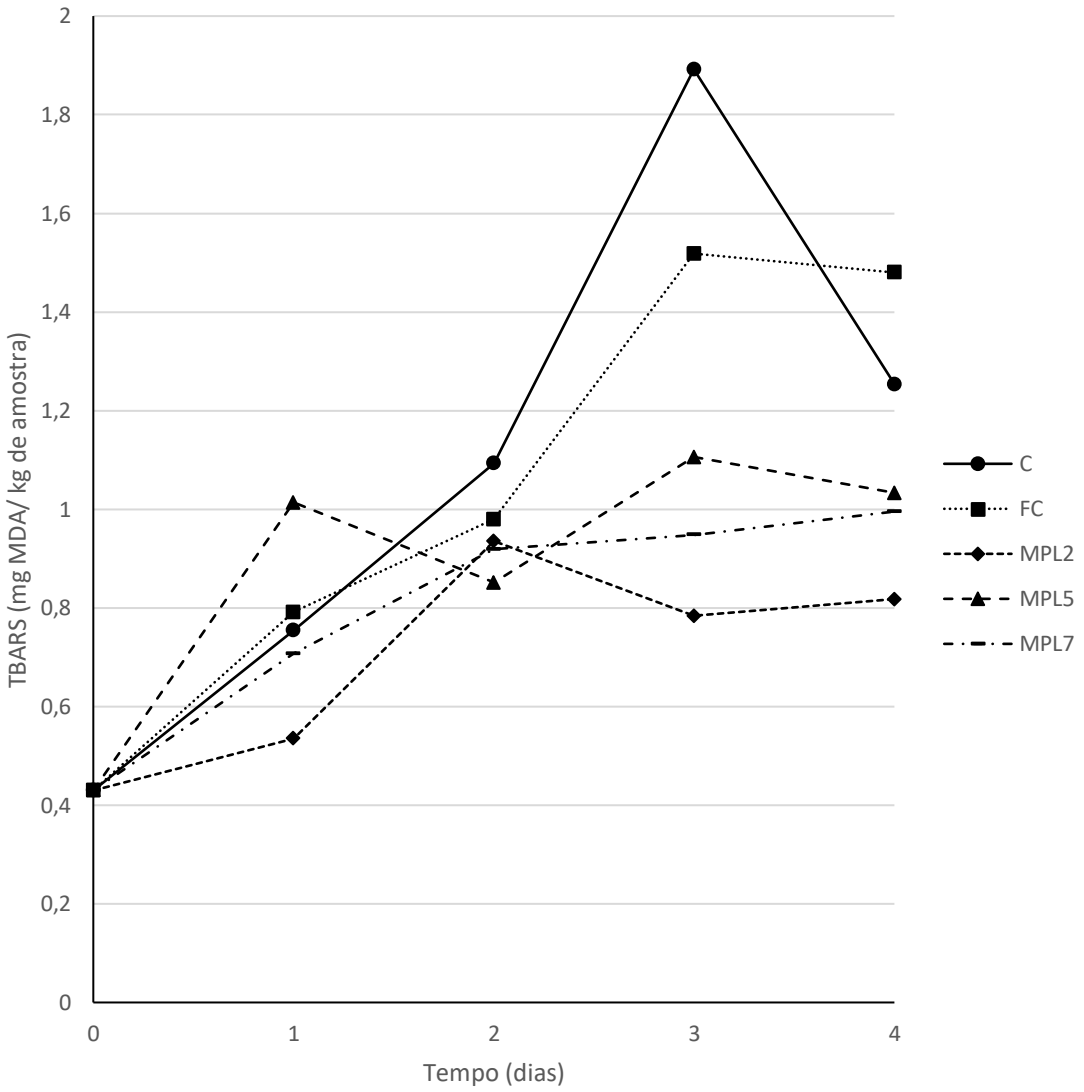


Figura 3 Valores de TBARS para carne moída acondicionadas sem (C) e com biopolímeros de IPS controle FC e adicionados de 0,25 (MPL2), 0,50 (MPL5) e 0,75% (MPL7) de MPL.

A avaliação oxidativa pelo índice de TBARS é baseada na quantificação do composto malonaldeído (MDA), um produto secundário relativamente estável derivado da degradação oxidativa de ácidos graxos poli-insaturados. É um dialdeído de três carbonos que pode existir em diferentes formas dependendo do valor de pH do meio (Amaral, Solva, & Lannes, 2018). Para carne bovina espera-se o aumento de seus valores com o passar do período de armazenamento (Osawa, De Felício, & Gonçalves, 2005).

Inicialmente, o valor de TBARS para a amostra de carne moída foi de 0,43 mg MDA/kg com aumento para até 1,89 mg MDA/kg durante o estudo. Outros trabalhos também encontraram valores iniciais reduzidos de TBARS para músculo bovino cru inteiro e moído (variando de 0,2 – 0,7 mg MDA/kg) com aumento no decorrer do tempo de armazenamento (Olivares, Dryahina, Španěl, & Flores, 2012; Trindade, Mancini-Filho, & Villavicencio, 2010). O rápido aumento do índice de TBARS durante o período analisado pode ser explicado devido à maior manipulação do alimento durante o preparo inicial de moagem que acarreta aumento da sua superfície de contato e pode favorecer a maior formação de produtos de oxidação e deterioração, o que justifica a escolha pelo tempo de análise de 4 dias.

Os valores de índice de TBARS apresentaram diferença significativa entre os tratamentos a partir do dia 1 de armazenamento a 4°C ± 1°C, com diminuição da formação do composto para o tratamento MPL2. A amostra de carne moída acondicionada em filme PVC (C) e a amostra embalada no filme de IPS controle (FC) apresentaram os maiores valores de TBARS ao final o período de análise (tempo 3 e 4). Os tratamentos MPL2, MPL5 e MPL7 apresentaram valores reduzidos de oxidação lipídica comparado aos dois tratamentos controle (C e FC) com menores valores de TBARS no tempo 3 e 4. Além disso, também pode-se observar que os tratamentos C e FC parecem atingir um valor máximo de produção do MDA no tempo 3 com início de sua degradação e consequente queda no dia 4, que pode estar relacionado à um pico de formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico e início de sua degradação, o que não acontece para os tratamentos acondicionados pelos filmes ativos onde se tem uma manutenção da quantidade de MDA em valores reduzidos do dia 2 ao dia 4.

Valores de TBARS reduzidos no último período de armazenamento de carnes embaladas em filmes de gelatina e lignina relacionando o resultado à ação antioxidante da lignina. De modo contrário, Núñez-Flores et al. (2013) não encontraram diferença significativa na redução dos valores de TBARS de carne embalada em filmes de gelatina e lignina ao longo do tempo de estudo, apesar de terem encontrado uma forte atividade antioxidante *in vitro* dos filmes relacionando o fato a uma possível dificuldade de liberação dos compostos antioxidantes para o alimento quando comparado à agua.

Ainda, é reportado na literatura que valores a partir de 2,0 mg MDA/ kg de carne já são suficientes para ocasionar mudanças perceptíveis e inaceitáveis nas características sensoriais da carne (Trindade et al., 2010). É importante considerar as diferenças nas metodologias de análise de índice de TBARS utilizadas (se a quente ou frio, reagentes, dentre outros) e como isso pode interferir nos valores

finais de MDA, porém, para o presente estudo, as amostras de carne moída acondicionadas pelos filmes controle (C e FC) apresentaram valores de TBARS bem próximos a 2,0 no tempo 3 de armazenamento a 4°C ± 1°C, chegando a 1,82 e 1,46 para os filmes C e FC, respectivamente, enquanto as amostras de filmes adicionados de MPL (MPL2, MPL5 e MPL7) se mantiveram abaixo da metade do limiar até o tempo 4, exceto para o tratamento LMP5 que apresentou TBARS de 1,06 e 1,08mg/kg nos tempos 3 e 4, respectivamente. Esse resultado pode ser considerado de extremo interesse da indústria, pois é uma alternativa para o retardo da oxidação lipídica da carne moída, com aumento de sua vida útil.

3.3 Identificação de compostos voláteis

A técnica de detecção de compostos voláteis por cromatografia gasosa (CG) é sensível, precisa e específica para a identificação de compostos derivados da oxidação lipídica. Neste estudo foram identificados 30 compostos de oxidação lipídica sendo sete deles presentes em todas as amostras de carne moída em todos os tempos, sendo eles: hidrocarbonetos pentadecano e octadecano e aldeídos hexanal, heptanal, octanal, nonanal e decanal. Os compostos voláteis são identificados na Tabela 1, juntamente com as médias de suas áreas relativas durante os tempos de estudo. Os compostos hexanal, heptanal e decanal foram afetados ($p<0,05$) pelo tratamento e tempo (Figura 4 e 5) enquanto pentadecano, octanal e nonanal foram afetados apenas de forma separada pelas variáveis (Tabela 1).

Observa-se aumento significativo ($p<0,05$) da área relativa ao pentadecano de acordo com o aumento da concentração de MPL adicionada ao biopolímero ativo (Tabela 1). Para o octadecano também se observa diminuição da área relativa ao longo do tempo de estudo, com pico máximo após 24 horas de acondicionamento. Porém, para ambos, não houve diferença significativa entre os tratamentos testados. Os hidrocarbonetos são resultantes da decomposição oxidativa dos lipídeos de cadeia longa presentes na carne bovina crua estando relacionados ao desenvolvimento de odor característico de degradação da carne (Insausti, Beriain, Gorraiz, & Purroy, 2002; Maggiolino et al., 2019). Estudos anteriores que analisaram a formação de hidrocarbonetos em carne bovina crua apresentaram comportamentos variados. Lyte et al. (2016) encontraram comportamento semelhante com aumento inicial da área do pico do octadecano e outros hidrocarbonetos e posterior diminuição em amostras de carne moída acondicionada em embalagem com monóxido de carbono durante 48 horas. Kong et al. (2017) também encontraram redução de octadecano em amostras de presunto irradiadas relacionando o hidrocarboneto a um dos compostos voláteis de maior poder odorante em carnes.

Tabela 1 Áreas dos picos relativos (10^3) dos compostos voláteis identificados nas carnes. Cada valor é a média de suas áreas durante os 4 dias de armazenamento.

Compostos	Tratamentos				
	C	FC	MPL2	MPL5	MPL7
Alcoóis					
3,4-butanediol	9,11	54,81	209,96	523,05	1025,61
2-octen-1-ol	16,82	26,08	24,65	17,39	9,05
1-octen-3-ol	88,18	84,00	64,50	99,07	82,65
Hexanol	94,92	102,99	61,76	103,14	64,15
2-etilhexanol	16,81	30,62	14,72	13,57	11,42
Heptanol	20,24	39,57	27,70	35,08	31,01
1-octanol	35,94	31,15	40,63	53,37	45,40
1-nonanol	12,91	9,72	25,27	36,41	34,57
1-undecanol	7,60	9,03	10,24	5,22	9,53
1-dodecanol	17,53	4,14	61,09	81,58	46,00
Hidrocarbonetos					
Estireno	45,22	47,39	34,56	31,89	21,19
Propano	11,93	7,94	10,65	n.a	n.a
Pentadecano	$2,74^{ab}$	$1,85^{a}$	$3,07^{abc}$	$4,49^{bc}$	$5,20^{c}$
Octadecano	6,90	5,67	8,22	7,07	8,36
Undecano	9,77	6,45	5,39	7,57	7,33
Aldeídos					
Hexanal	62,78	35,69	20,57	9,82	8,77
Heptanal	35,59	24,96	18,35	13,69	10,43
Octanal	$33,83^{b}$	$31,99^{b}$	$36,17^{b}$	$35,09^{b}$	$14,64^{a}$
Nonanal	$117,95^{a}$	$89,59^{ab}$	$119,62^{a}$	$132,46^{a}$	$67,78^{b}$
2-nonenal	8,78	17,60	27,82	12,97	7,47
Decanal	5,35	6,81	5,38	17,36	22,55
Dodecanal	4,30	3,77	3,63	4,15	n.a
Tetradecanal	23,91	25,12	32,72	23,62	11,42
Cetonas					
2-heptanona	13,15	14,68	12,13	11,16	10,48
3-octanona	n.a	n.a	16,68	13,08	10,94
Fenilacetaldeído	60,20	18,52	31,68	34,41	23,17
Diversos					
Hexametilciclotrisiloxano	27,01	16,39	12,79	17,42	14,67
Octametiltetrasiloxano	17,41	9,64	8,76	7,27	9,38
Pyrrolidine2,4-dione	24,92	42,71	25,07	18,47	n.a
2-pentylfuran	16,69	15,32	15,60	13,77	7,13

Letras minúsculas diferentes na mesma linha significa que houve diferença significativa entre os resultados pelo teste de Tukey ($p<0,05$).

Os aldeídos lineares saturados e insaturados com mais de cinco átomos de carbono podem ser produzidos a partir da degradação oxidativa da gordura e do metabolismo de micro-organismos e são utilizados como indicadores da oxidação de carne (Argyri, Mallouchos, Panagou, & Nychas, 2015). O hexanal, heptanal e octanal são formados durante a oxidação do ácido linoleico e servem como indicadores do estrago e rancidez da carne (Alnoumani et al., 2017). Os resultados mostram interação significativa entre os tempos e tratamentos para o hexanal e heptanal com menor formação de ambos os compostos após 24 horas de acondicionamento das carnes nos filmes ativos (MPL2, MPL5 e MPL7) comparados aos dois controles (C e FC) (Figura 4). Também houve uma manutenção de valores

reduzidos dos compostos durante todo o período analisado para os filmes ativos, com áreas significativamente menores ao final do estudo para o hexanal (Figura 3). O hexanal vem sendo utilizado como um indicador da degradação e rancificação da carne bovina já bem documentado, sendo relacionado à sua vida útil (Insausti et al., 2002; Lyte et al., 2016). Zadeh et al. (2019) também encontraram efeito positivo na redução da área dos picos relativos ao hexanal e heptanal de óleo de soja e peixe embalados em filmes de isolado proteico de soja e lignina durante 2 e 4 semanas, relacionando-as à ação antioxidante da lignina e a boa compatibilidade entre ela e a matriz polimérica do filme.

Ainda, a diferença mais pronunciada na formação de hexanal e heptanal após 24 horas, com redução de 95,6% e 90,4% de suas áreas, respectivamente, para o tratamento MPL7 comparado a C, pode ser correlacionada aos resultados encontrados para atividade antioxidante dos biopolímeros pelo sequestro de radicais livres DPPH, onde se observou uma atividade antioxidante mais intensa nas primeiras 6 horas de reação, com diminuição mas manutenção do crescimento da atividade de sequestro dos radicais livres nas últimas 18 horas analisadas. Pode-se supor que uma vez liberadas para a matriz alimentícia, as moléculas de MPL possuem boa eficiência em estabilizar os radicais livres presentes, saturando, mas mantendo sua atividade antioxidante a partir dos momentos iniciais de contato. Crouvisier-Urion et al. (2016) encontraram resultados semelhantes ao analisarem a atividade antioxidante de filmes de quitosana incorporados de lignina durante 72 horas. Em seu estudo, os autores observaram um aumento mais intenso da atividade antioxidante nas primeiras 10 horas de análise, com atividade de sequestro de radicais livres próxima a 60%.

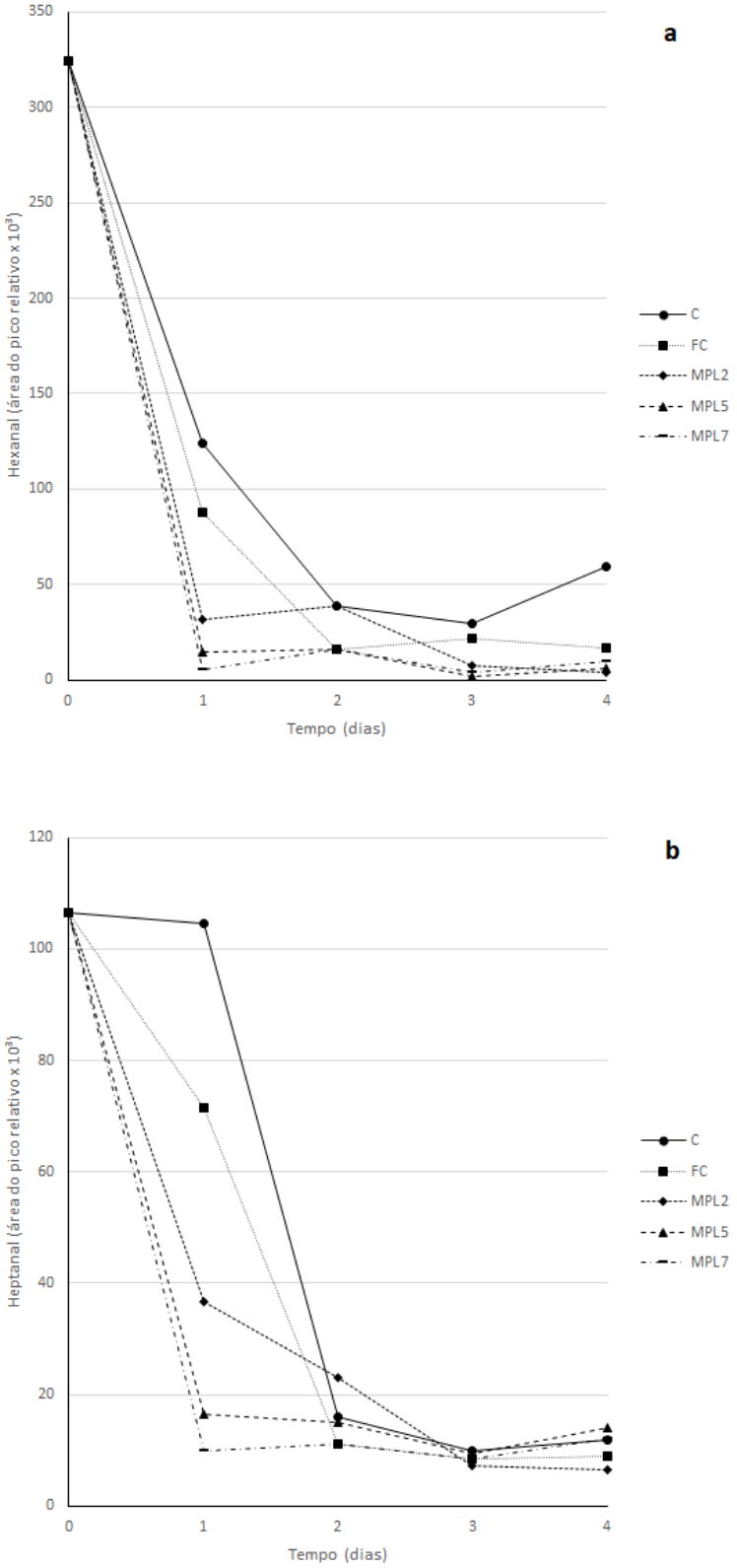


Figura 4 Área relativa dos picos (10^3) dos compostos voláteis hexanal (a), heptanal (b) em amostras de carne moída sem (C) e com biopolímeros de IPS controle FC e adicionados de 0,25 (MPL2), 0,50 (MPL5) e 0,75% (MPL7) de MPL.

O octanal apresentou diferença significativa na redução de sua área relativa entre os tratamentos com diminuição da formação do composto para a carne acondicionada por MPL7 (Tabela 1). Também houve redução da área do composto após 24 horas, com manutenção dos valores pelo restante do período analisado.

O nonanal é derivado da oxidação do ácido oleico e foi encontrado em boa proporção nas amostras, podendo ser explicado devido ao fato de o ácido oleico ser um dos ácidos graxos mais abundantes na carne bovina o que favorece a produção dos compostos voláteis derivados de sua oxidação (Alnoumani et al., 2017). Os resultados foram semelhantes ao encontrado para o octanal, com diminuição da formação do composto para a carne acondicionada por MPL7 e redução da área do composto após 24 horas, com manutenção dos valores pelo restante do período analisado.

O decanal é relacionado ao odor de sabão das carnes. Seu comportamento também apresentou diferença significativa entre os tempos e tratamentos testados (Figura 5), porém o que se observou foi uma maior produção do composto para a amostra acondicionada pelo filme MPL7 e menores valores para MPL2 e C após 24 horas. Ainda, observou-se um aumento da área relativa a esse composto no tempo 3 para MPL5, com posterior queda no tempo 4. Esses comportamentos são difíceis de serem explicados, mas também foram encontrados por outros autores. Lyte et al. (2016) também encontraram aumento da área relativa ao decanal em amostras de carne moída embaladas sob atmosfera de O_2 após 24 horas com redução em 48 horas. Argyri et al. (2015) encontraram aumento da área relativa do composto em amostras de carne moída embaladas sob atmosfera de O_2 após 114 horas de armazenamento a 5°C e diminuição após 162 horas.

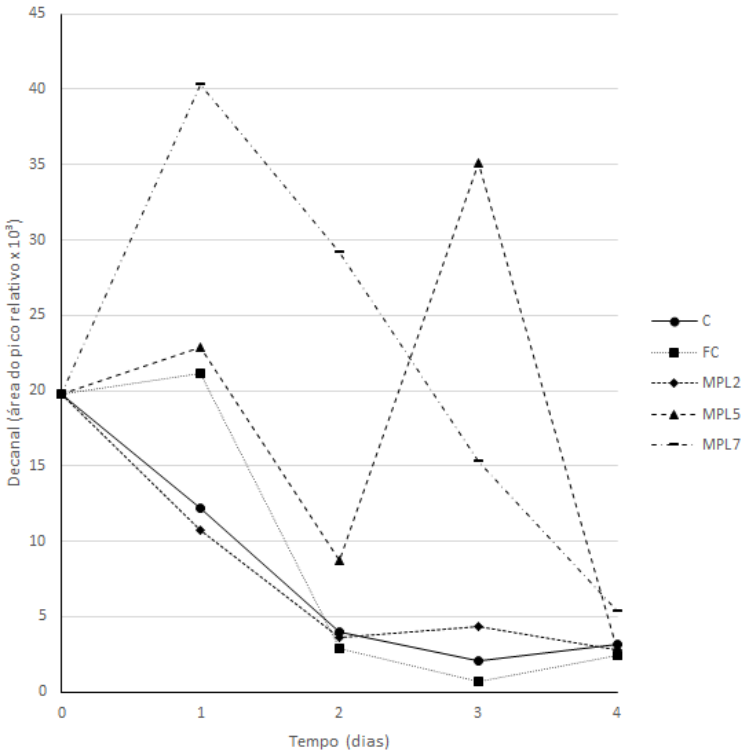


Figura 5 Área relativa dos picos (10^3) do composto volátil decanal em amostras de carne moída sem (C) e com biopolímeros de IPS controle FC e adicionados de 0,25 (MPL2), 0,50 (MPL5) e 0,75% (MPL7) de MPL.

A diminuição dos hidrocarbonetos e aldeídos ao longo do período de armazenamento também é encontrada por outros autores ao estudarem carne *in natura* moída acondicionadas sob O_2 (Argyri et al., 2015; Lyte et al., 2016). O comportamento pode estar relacionado a fatores como: produção de compostos derivados da oxidação durante o processo de moagem da carne que explicaria o aumento inicial, com posterior supressão da produção desses compostos devido à redução do contato das amostras com O_2 pela utilização das embalagens, degradação de compostos voláteis já formados devido à sua volatilidade ou ação microbiana, variações na composição da carne e características bioquímicas, além da ocorrência de mecanismos alternativos de oxidação como a foto-oxidação e oxidação enzimática durante o período de armazenamento.

Para este estudo, a utilização da embalagem de IPS pode favorecer a supressão da oxidação lipídica por se tratar de um material com elevada propriedade de barreira ao oxigênio (Weizman, Dotan, Nir, & Ophir, 2017). O oxigênio atua como catalisador da oxidação lipídica, favorecendo o início e propagação da reação com consequente aumento dos produtos da oxidação, portanto a diminuição de contato da carne com o oxigênio poderia ter favorecido a diminuição da oxidação lipídica desses tratamentos. Além disso, o IPS sozinho pode apresentar leve atividade antioxidante como discutido nos resultados de atividade antioxidante dos biopolímeros, contribuindo para os resultados encontrados.

3.4 Formas redox da mioglobina e análise de cor objetiva

O efeito da utilização dos biopolímeros ativos nas formas químicas da mioglobina e na cor CIE das amostras de carne moída estão demonstrados na Figura 6 e Tabela 2.

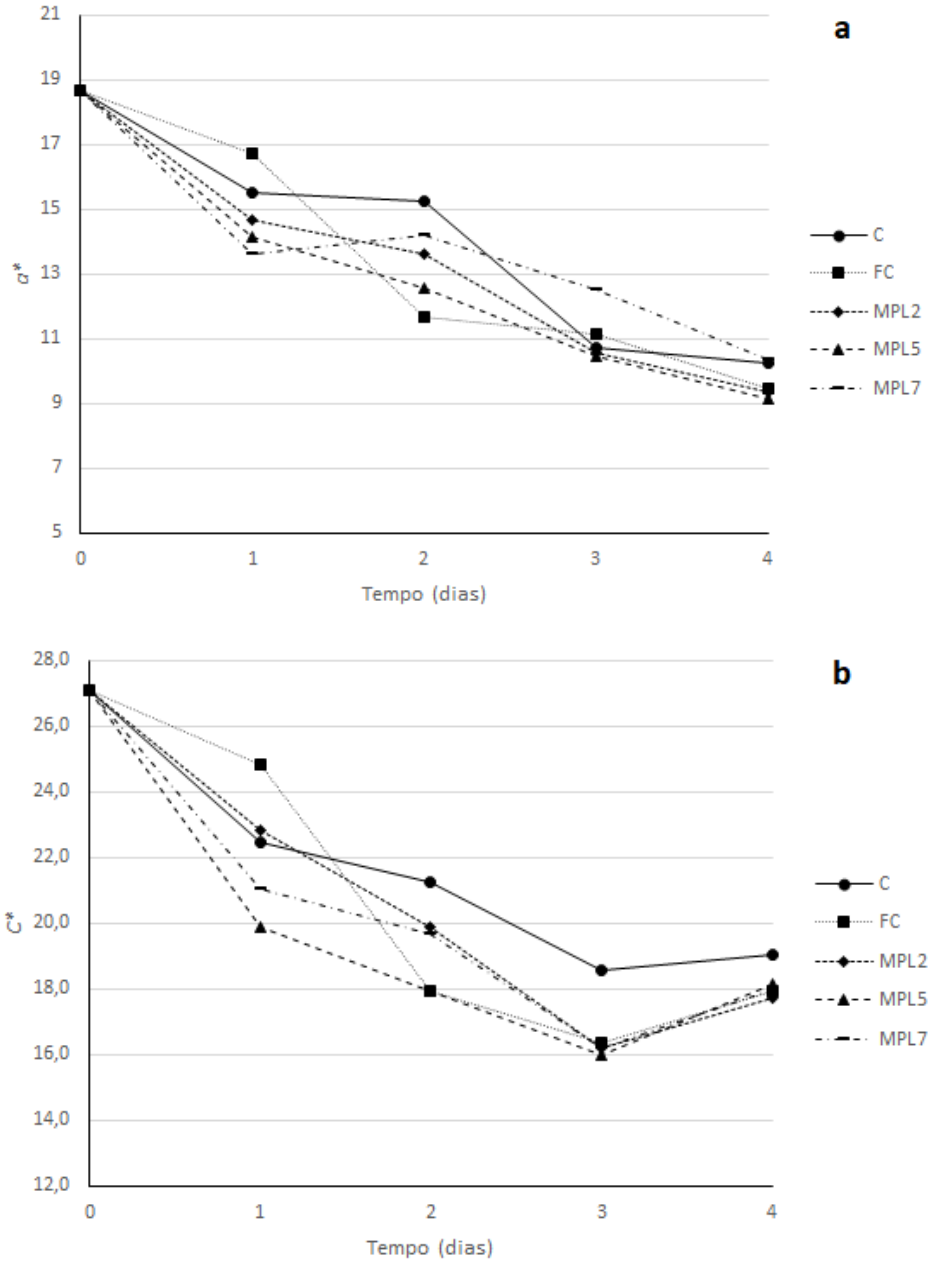


Figura 6 Valores de *a** (a) e *C** (b) para as amostras de carne moída sem (C) e com biopolímeros de IPS controle FC e adicionados de 0,25 (MPL2), 0,50 (MPL5) e 0,75% (MPL7) de MPL.

Tabela 2 Valores de *L**, *b**, *h**, % MMb e %OMb de carne moída embalada em diferentes biopolímeros. Cada valor é a média de cada parâmetro durante os 4 dias de armazenamento para todos os tratamentos.

Parâmetro	Tempo				
	0	1	2	3	4
*L**	$46,29^{a} \pm 0,20$	$44,75^{b} \pm 1,32$	$44,42^{b} \pm 2,13$	$46,00^{a} \pm 2,42$	$46,38^{a} \pm 2,10$
*b**	$17,67^{a} \pm 0,26$	$14,80^{b} \pm 1,27$	$14,16^{b} \pm 1,41$	$13,51^{b} \pm 1,90$	$14,23^{b} \pm 1,41$
h	$40,88^{a} \pm 2,29$	$41,97^{a} \pm 2,89$	$47,26^{b} \pm 2,98$	$54,20^{c} \pm 4,20$	$51,27^{bc} \pm 4,56$
% MMb	$35,32^{a} \pm 5,60$	$37,79^{a} \pm 6,30$	$48,95^{b} \pm 5,27$	$61,30^{c} \pm 6,26$	$56,30^{c} \pm 7,90$
%OMb	$57,24^{a} \pm 4,25$	$53,98^{a} \pm 5,09$	$42,11^{b} \pm 5,02$	$29,94^{c} \pm 5,46$	$34,78^{c} \pm 6,52$

Letras minúsculas diferentes na mesma linha significa que houve diferença significativa entre os resultados pelo teste de Tukey ($p<0,05$).

As formas redox da mioglobina, metamioglobina (MMb) e oximioglobina (OMb) foram afetadas ($p<0,05$) apenas pelo fator tempo (Tabela 2) enquanto não foram observadas interações significativas para deoximioglobina (DMb). De modo geral, observou-se o aumento da MMb e diminuição de OMb com o aumento dos dias, comportamento esperado para esses pigmentos. Essa alteração indica a oxidação dos pigmentos heme durante o armazenamento das carnes e está relacionado a descoloração das carnes e oxidação lipídica. Os pigmentos podem influenciar na oxidação lipídica de dois modos: a mioglobina atua como fonte de ferro iônico livre ou hematina que podem catalisar a reação; ou ainda, a MMb pode interagir com produtos primários da oxidação (hidroperóxidos ou peróxido de hidrogênio), dando origem a compostos intermediários (radicais peroxil e alcoxil) que vão atuar nas etapas de iniciação, propagação e terminação da oxidação lipídica (Amaral et al., 2018; Faustman, Sun, Mancini, & Suman, 2010).

A interação entre tratamento e tempo de armazenamento afetaram ($p<0,05$) apenas os valores de *a** (vermelhidão) e *C** (saturação) do índice de cores CIE (Figura 6), sendo a média dos demais parâmetros (*L*, b* e h**) afetados apenas pelo tempo e apresentados na Tabela 2.

A luminosidade (*L**) da carne bovina apresenta redução com o tempo de armazenamento do produto, que foi observada nos dias 1 e 2, porém também houve manutenção da média inicial (dia 0) para os dias 3 e 4 (Tabela 2). Diversos fatores podem influenciar na luminosidade das carnes, o que pode ter influenciado os resultados variados encontrados, como: seu teor de água, superfície de amostragem com mais ou menos presença de gordura/músculo e luz ambiente. Seu escurecimento também pode ser explicado pela oxidação da OMb em MMb observada, e à formação de catalisadores da oxidação lipídica durante esse processo, favorecendo a descoloração da carne como explicado anteriormente (Amaral et al., 2018; Núñez-Flores et al., 2013).

O índice *a** está relacionado a cor vermelha/verde da superfície das amostras, sendo a manutenção de seu valor ligado a aceitação do produto por parte do consumidor (Weizman et al., 2017). Para as amostras analisadas, observa-se que todos os tratamentos apresentaram valores positivos, porém com redução durante o período de armazenamento (Figura 6). Entre os tratamentos, as médias das

amostras C e MPL5 durante o tempo foram as únicas que apresentaram diferença significativa entre si, com valores menores de *a** para MPL5. Apesar de não ter havido diferença significativa do teor de OMb e MMb entre os tratamentos, a redução da cor vermelha observada durante o tempo é esperada e pode ser confirmada também visualmente (Figura 7), estando relacionada e confirmada pela degradação de OMb, pigmento de coloração vermelho brilhante e formação de MMb, pigmento de coloração marrom.

O valor de *b** também apresentou redução com o tempo de armazenamento para todos os tratamentos (Tabela 2). Sánchez-Escalante et al. (2003) também não encontraram nenhuma diferença significativa para os valores de *b** entre os tratamentos de carne moída adicionada de antioxidantes naturais e embaladas sob atmosfera modificada armazenada a 2°C durante o período de estudo.

O índice *C** ou saturação indica à intensidade da cor, sendo amostras com elevado valor de *C** consideradas saturadas e as que apresentam valores reduzidos consideradas pálidas. As amostras apresentaram diminuição de *C** ao longo do tempo (Figura 5), indicando perda da intensidade da cor inicial e está relacionado à degradação de OMb e formação de MMb. Ainda, o tratamento C foi capaz de manter os valores de saturação mais altos comparado aos outros tratamentos. Carvalho et al. (2019) encontraram resultados semelhantes para amostras de carne moída acondicionadas em filmes de IPS, nanofibra de celulose e óleo essencial de tomilho (*C** variando de aproximadamente 19-32) onde houve redução de *C** ao longo de 4 dias de armazenamento das amostras a 4°C ± 1°C.

O índice *h* ou ângulo de tonalidade indica o tom de cor (vermelho, verde, azul, etc) sendo o sólido de cor referente aos valores encontrados para *h* dividido em quatro quadrantes. Os valores encontrados para os tratamentos não apresentaram diferença significativa exceto para os tempos analisados (Tabela 2) e os valores encontrados saem de 40 e chegam a 51 no dia 4, estimando a coloração vermelha a alaranjada das amostras.

A Figura 7 representa as imagens das amostras de carne moída para os tratamentos durante os tempos. Visualmente é claro perceber que as amostras de carne moída saem de uma tonalidade de vermelho brilhante para marrom durante os dias de armazenamento, confirmados pelos valores de *h** (Tabela 2). Porém, também se observa a presença de pontos mais avermelhados nos tratamentos acondicionados pelos biopolímeros que não estão presentes na amostra C a partir do tempo 3. Esperava-se que esses pontos favorecem a manutenção dos valores de *a** das amostras o que não foi confirmado através da leitura pelo colorímetro. Esse fato pode ser explicado por Girolami et al. (2013). Os autores comprovaram que existe uma limitação nos resultados das leituras de *L**, *a**, *b**, *h** e *C** das carnes realizadas por colorímetro, sendo os valores obtidos não apenas da superfície da amostra, mas também oriundos da penetração e difusão da luz do colorímetro pelo interior da amostra, diferindo das cores observadas visualmente.

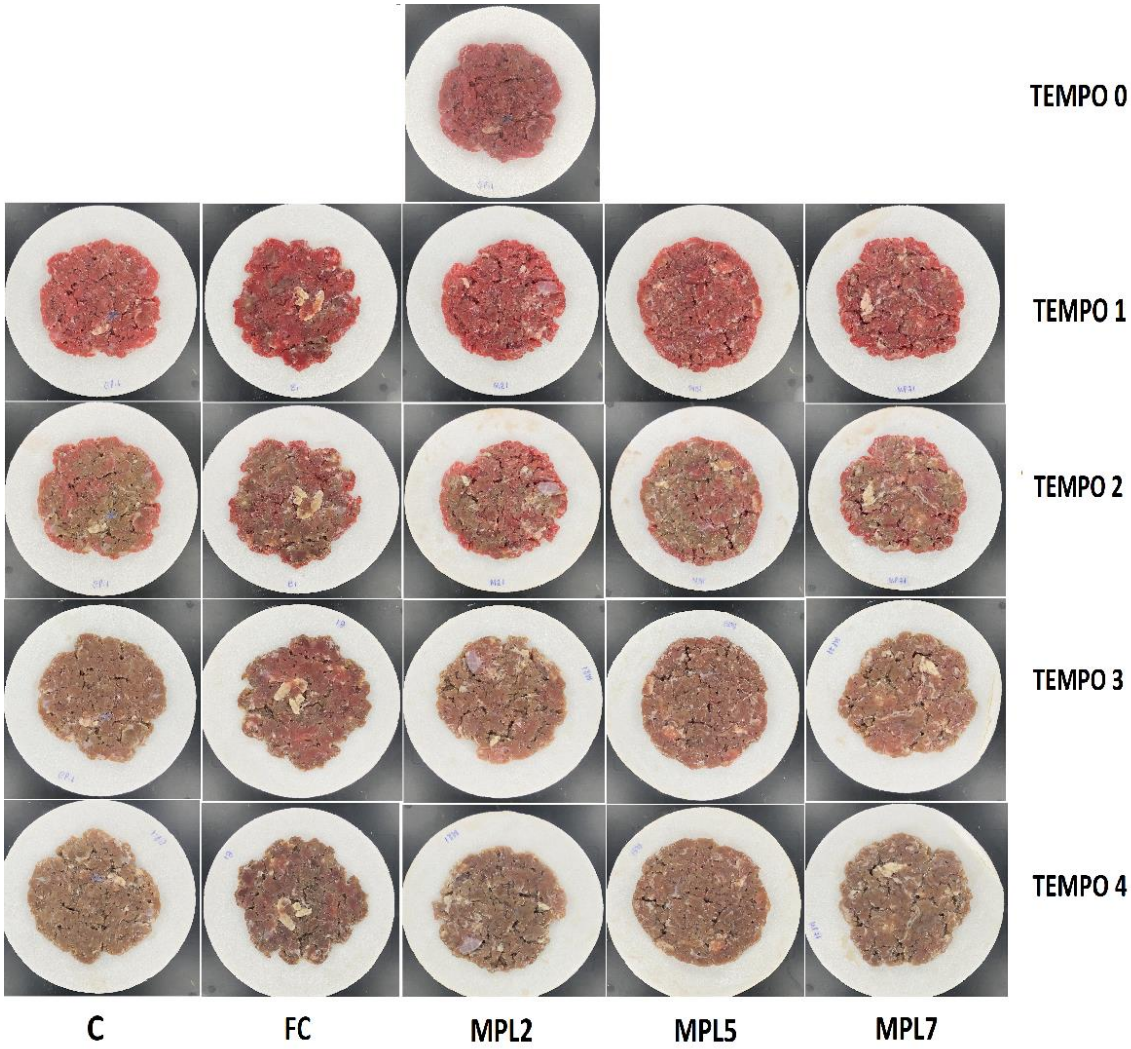


Figura 7 Imagens das amostras de carne moída acondicionadas em diferentes biopolímeros.

4 Conclusão

Com este estudo, sugere-se que a utilização da concentração de 0,50% (p/p) de MPL aos filmes de IPS seja suficiente para fornecer atividade antioxidante a esse material permitindo sua utilização no controle da oxidação lipídica de carne moída pelo período e condições estudadas.

Agradecimentos

Os autores agradecem à FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais), ao CNPq (Conselho Nacioanal de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo apoio financeiro e bolsas de estudo. Os autores gostariam de agradecer à Central de Análise e Prospecção Química da UFLA pelo fornecimento de equipamentos e suporte técnico para as análises envolvendo CG-MS.

Referências

Alnoumani, H., Ataman, Z. A., & Were, L. (2017). Lipid and protein antioxidant capacity of dried Agaricus bisporus in salted cooked ground beef. *Meat Science*, *129*, 9–19. https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2017.02.010

Alvarenga, R., Gomide, C., Carolina, A., Oliveira, S. De, Aparecida, D., & Rodrigues, C. (2020). Development and Characterization of Lignin Microparticles for Physical and Antioxidant Enhancement of Biodegradable Polymers. *Journal of Polymers and the Environment*, (0123456789). https://doi.org/10.1007/s10924-020-01685-z

Amaral, A. B., Solva, M. V. Da, & Lannes, S. C. D. S. (2018). Lipid oxidation in meat: Mechanisms and protective factors - a review. *Food Science and Technology*, *38*, 1–15. https://doi.org/10.1590/fst.32518

Amiri, E., Aminzare, M., Azar, H. H., & Mehrasbi, M. R. (2019). Combined antioxidant and sensory effects of corn starch films with nanoemulsion of Zataria multiflora essential oil fortified with cinnamaldehyde on fresh ground beef patties. *Meat Science*, *153*(February), 66–74. https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2019.03.004

Anderson, G. H., & Moore, S. E. (2004). The Emerging Role of Dairy Proteins and Bioactive Peptides in Nutrition and Health Dietary Proteins in the Regulation of Food Intake and Body Weight in Humans. *Journal of Nutrition*, *134*(4), 974–979. https://doi.org/10.1128/JB.188.5.1691

Argyri, A. A., Mallouchos, A., Panagou, E. Z., & Nychas, G. J. E. (2015). The dynamics of the HS/SPME-GC/MS as a tool to assess the spoilage of minced beef stored under different packaging and temperature conditions. *International Journal of Food Microbiology*, *193*, 51–58. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.09.020

Azevedo, Viviane M., Dias, M. V., Borges, S. V., Costa, A. L. R., Silva, E. K., Medeiros, ??ber Antonio A, & Soares, N. de F. F. (2015). Development of whey protein isolate bio-nanocomposites: Effect of montmorillonite and citric acid on structural, thermal, morphological and mechanical properties. *Food Hydrocolloids*, *48*, 179–188. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.02.014

Azevedo, Viviane Machado, Carvalho, R. A., Borges, S. V., Claro, P. I. C., Hasegawa, F. K., Yoshida, M. I., & Marconcini, J. M. (2019). Thermoplastic starch/whey protein isolate/rosemary essential oil nanocomposites obtained by extrusion process: Antioxidant polymers. *Journal of Applied Polymer Science*, *136*(23), 1–12. https://doi.org/10.1002/app.47619

Beisl, S., Friedl, A., & Miltner, A. (2017). Lignin from micro- To nanosize: Applications. *International Journal of Molecular Sciences*, *18*(11). https://doi.org/10.3390/ijms18112367

Cárdenas, F. C., Giannuzzi, L., & Zaritzky, N. E. (2008). Mathematical modelling of microbial growth in ground beef from Argentina. Effect of lactic acid addition, temperature and packaging film. *Meat Science*, *79*(3), 509–520. https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2007.12.003

Cardoso, G. P., Andrade, M. P. D., Rodrigues, L. M., Massingue, A. A., Fontes, P. R., Ramos, A. de L. S., & Ramos, E. M. (2019). Retail display of beef steaks coated with monolayer and bilayer chitosan-gelatin composites. *Meat Science*, *152*(November 2018), 20–30. https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2019.02.009

Cardoso, G. P., Dutra, M. P., Fontes, P. R., Ramos, A. de L. S., Gomide, L. A. de M., & Ramos, E. M. (2016). Selection of a chitosan gelatin-based edible coating for color preservation of beef in retail

display. *Meat Science*, *114*, 85–94. https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2015.12.012

Carvalho, R. A., Santos, T. A., de Oliveira, A. C. S., de Azevedo, V. M., Dias, M. V., Ramos, E. M., & Borges, S. V. (2019). Biopolymers of WPI/CNF/TEO in preventing oxidation of ground meat. *Journal of Food Processing and Preservation*, (September), 1–10. https://doi.org/10.1111/jfpp.14269

Chen, K., Ye, D., Gu, S., & Zhou, Y. (2018). Thermal-oxidative effect of Kraft lignin antioxidant in polypropylene: Uncovering the key factor using correlation analysis model. *International Journal of Biological Macromolecules*, *107*(PartA), 478–485. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.09.016

Crouvisier-Urion, K., Bodart, P. R., Winckler, P., Raya, J., Gougeon, R. D., Cayot, P., … Karbowiak, T. (2016). Biobased Composite Films from Chitosan and Lignin: Antioxidant Activity Related to Structure and Moisture. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, *4*(12), 6371–6381. https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.6b00956

Crouvisier-Urion, K., Regina da Silva Farias, F., Arunatat, S., Griffin, D., Gerometta, M., Rocca-Smith, J. R., … Karbowiak, T. (2019). Functionalization of chitosan with lignin to produce active materials by waste valorization. *Green Chemistry*, *21*(17), 4633–4641. https://doi.org/10.1039/c9gc01372e

de Souza, R. S. C., Tonon, R. V., Stephan, M. P., Silva, C. M., Penteado, A. L., Cabral, L. M. C., & Kurozawa, L. E. (2019). Evaluation of the antioxidant potential of whey protein concentrated by ultrafiltration and hydrolyzed by different commercial proteases. *Brazilian Journal of Food Technology*, *22*(Atcc 13076), 1–11. https://doi.org/10.1590/1981-6723.02118

Elzaawely, A. A., Maswada, H. F., El-Sayed, M. E. A., & Ahmed, M. E. (2017). Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Rice Straw Extract. *International Letters of Natural Sciences*, *64*, 1–9. https://doi.org/10.18052/www.scipress.com/ilns.64.1

Faustman, C., Sun, Q., Mancini, R., & Suman, S. P. (2010). Myoglobin and lipid oxidation interactions: Mechanistic bases and control. *Meat Science*, *86*(1), 86–94. https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2010.04.025

García, A., Erdocia, X., González Alriols, M., & Labidi, J. (2012). Effect of ultrasound treatment on the physicochemical properties of alkaline lignin. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, *62*, 150–158. https://doi.org/10.1016/j.cep.2012.07.011

Gilca, I. A., Popa, V. I., & Crestini, C. (2015). Obtaining lignin nanoparticles by sonication. *Ultrasonics Sonochemistry*, *23*, 369–375. https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2014.08.021

Girolami, A., Napolitano, F., Faraone, D., & Braghieri, A. (2013). Measurement of meat color using a computer vision system. *Meat Science*, *93*(1), 111–118. https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2012.08.010

Guo, Y., Tian, D., Shen, F., Yang, G., Long, L., He, J., … Deng, S. (2019). Transparent cellulose/technical lignin composite films for advanced packaging. *Polymers*, *11*(9), 1–11. https://doi.org/10.3390/polym11091455

He, X., Luzi, F., Hao, X., Yang, W., Torre, L., Xiao, Z., … Puglia, D. (2019). Thermal, antioxidant and swelling behaviour of transparent polyvinyl (alcohol) films in presence of hydrophobic citric acid-modified lignin nanoparticles. *International Journal of Biological Macromolecules*, *127*, 665–676. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.01.202

Insausti, K., Beriain, M. J., Gorraiz, C., & Purroy, A. (2002). Volatile compounds of raw beef from 5 local Spanish cattle breeds stored under modified atmosphere. *Journal of Food Science*, *67*(4), 1580–1589. https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2002.tb10325.x

Jay, J. M., Vilai, J. P., & Hughes, M. E. (2002). Profile and activity of the bacterial biota of ground beef held from freshness to spoilage at 5-7°C. *International Journal of Food Microbiology*, *81*(2), 105–111. https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00189-7

Kim, J. H., Lee, J. W., Shon, S. H., Jang, A., Lee, K. T., Lee, M., & Jo, C. (2008). Reduction of volatile compounds and off-odor in irradiated ground pork using a charcoal packaging. *Journal of Muscle Foods*, *19*(2), 194–208. https://doi.org/10.1111/j.1745-4573.2008.00112.x

Klein, S. E., Rumpf, J., Alzagameem, A., Rehahn, M., & Schulze, M. (2019). Antioxidant activity of unmodified kraft and organosolv lignins to be used as sustainable components for polyurethane coatings. *Journal of Coatings Technology and Research*, *16*(6), 1543–1552. https://doi.org/10.1007/s11998-019-00201-w

Kong, Q., Yan, W., Yue, L., Chen, Z., Wang, H., Qi, W., & He, X. (2017). Volatile compounds and odor traits of dry-cured ham (Prosciutto crudo) irradiated by electron beam and gamma rays. *Radiation Physics and Chemistry*, *130*, 265–272. https://doi.org/10.1016/j.radphyschem.2016.09.008

Krzywicki, K. (1979). Assessment of relative content of myoglobin, oxymyoglobin and metmyoglobin at the surface of beef. *Meat Science*, *3*(1), 1–10. https://doi.org/10.1016/0309-1740(79)90019-6

Lara, B. R. B., Araújo, A. C. M. A., Dias, M. V., Guimarães, M., Santos, T. A., Ferreira, L. F., & Borges, S. V. (2019). Morphological, mechanical and physical properties of new whey protein isolate/ polyvinyl alcohol blends for food flexible packaging. *Food Packaging and Shelf Life*, *19*(November 2018), 16–23. https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2018.11.010

López-Hernández, L. H., Calderón-Oliver, M., Soriano-Santos, J., Severiano-Pérez, P., Escalona-Buendía, H. B., & Ponce-Alquicira, E. (2018). Development and antioxidant stability of edible films supplemented with a tamarind seed extract. *Revista Mexicana de Ingeniera Quimica*, *17*(3), 975–987. https://doi.org/10.24275/uam/izt/dcbi/revmexingquim/2018v17n3/Lopez

Lyte, J. M., Legako, J. F., Martin, J. N., Thompson, L., Surowiec, K., & Brooks, J. C. (2016). Volatile compound characterization of modified atmosphere packaged ground beef held under temperature abuse. *Food Control*, *59*, 1–6. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.04.041

Maggiolino, A., Lorenzo, J. M., Marino, R., della Malva, A., Centoducati, P., & De Palo, P. (2019). Foal meat volatile compounds: effect of vacuum ageing on semimembranosus muscle. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *99*(4), 1660–1667. https://doi.org/10.1002/jsfa.9350

Mohammad Zadeh, E., O'Keefe, S. F., & Kim, Y. T. (2019). Lignin-Based Biopolymeric Active Packaging System for Oil Products. *Journal of Food Science*, *84*(6), 1420–1426. https://doi.org/10.1111/1750-3841.14632

Mohanty, D. P., Mohapatra, S., Misra, S., & Sahu, P. S. (2016). Milk derived bioactive peptides and their impact on human health – A review. *Saudi Journal of Biological Sciences*, *23*(5), 577–583. https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2015.06.005

Núñez-Flores, R., Giménez, B., Fernández-Martín, F., López-Caballero, M. E., Montero, M. P., & Gómez-Guillén, M. C. (2013). Physical and functional characterization of active fish gelatin films incorporated with lignin. *Food Hydrocolloids*, *30*(1), 163–172. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.05.017

Ojagh, S. M., Núñez-Flores, R., López-Caballero, M. E., Montero, M. P., & Gómez-Guillén, M. C. (2011). Lessening of high-pressure-induced changes in Atlantic salmon muscle by the combined use of a fish gelatin-lignin film. *Food Chemistry*, *125*(2), 595–606. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.08.072

Olivares, A., Dryahina, K., Španěl, P., & Flores, M. (2012). Rapid detection of lipid oxidation in beef

muscle packed under modified atmosphere by measuring volatile organic compounds using SIFT-MS. *Food Chemistry*, *135*(3), 1801–1808. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.06.075

Osawa, C. C., De Felício, P. E., & Gonçalves, L. A. G. (2005). Teste de TBA aplicado a carnes e derivados: Métodos tradicionais, modificados e alternativos. *Quimica Nova*, *28*(4), 655–663. https://doi.org/10.1590/s0100-40422005000400019

Raharjo, S., Sofos, J. N., & Schmidt, G. R. (1992). Improved Speed, Specificity, and Limit of Determination of an Aqueous Acid Extraction Thiobarbituric Acid-C18 Method for Measuring Lipid Peroxidation in Beef. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *40*(11), 2182–2185. https://doi.org/10.1021/jf00023a027

Sánchez-Escalante, A., Torrescano, G., Djenane, D., Beltrán, J. A., & Roncalés, P. (2003). Stabilisation of colour and odour of beef patties by using lycopene-rich tomato and peppers as a source of antioxidants. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *83*(3), 187–194. https://doi.org/10.1002/jsfa.1298

Santos, P. S. B. do., Erdocia, X., Gatto, D. A., & Labidi, J. (2014). Characterisation of Kraft lignin separated by gradient acid precipitation. *Industrial Crops and Products*, *55*, 149–154. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.01.023

Sun, M., Liu, N., Ni, S., Bian, H., Fu, Y., & Chen, X. (2019). Poplar hot water extract enhances barrier and antioxidant properties of chitosan/bentonite composite film for packaging applications. *Polymers*, *11*(10). https://doi.org/10.3390/polym11101614

Toh, K., Yokoyama, H., Noda, H., & Yuguchi, Y. (2010). Antioxidant capacity of lignin from green tea waste. *Journal of Food Biochemistry*, *34*(SUPPL. 1), 192–206. https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.2009.00324.x

Trindade, R. A., Mancini-Filho, J., & Villavicencio, A. L. C. H. (2010). Natural antioxidants protecting irradiated beef burgers from lipid oxidation. *LWT - Food Science and Technology*, *43*(1), 98–104. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2009.06.013

Weizman, O., Dotan, A., Nir, Y., & Ophir, A. (2017). Modified whey protein coatings for improved gas barrier properties of biodegradable films. *Polymers for Advanced Technologies*, *28*(2), 261–270. https://doi.org/10.1002/pat.3882

Yang, W., Fortunati, E., Bertoglio, F., Owczarek, J. S., Bruni, G., Kozanecki, M., … Puglia, D. (2018). Polyvinyl alcohol/chitosan hydrogels with enhanced antioxidant and antibacterial properties induced by lignin nanoparticles. *Carbohydrate Polymers*, *181*(August 2017), 275–284. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.10.084

Yang, W., Owczarek, J. S., Fortunati, E., Kozanecki, M., Mazzaglia, A., Balestra, G. M., … Puglia, D. (2016). Antioxidant and antibacterial lignin nanoparticles in polyvinyl alcohol/chitosan films for active packaging. *Industrial Crops and Products*, *94*(January), 800–811. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.09.061

Yang, Weijun, Fortunati, E., Gao, D., Balestra, G. M., Giovanale, G., He, X., … Puglia, D. (2018). Valorization of Acid Isolated High Yield Lignin Nanoparticles as Innovative Antioxidant/Antimicrobial Organic Materials. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, *6*(3), 3502–3514. https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.7b03782

Zhou, G. H., Xu, X. L., & Liu, Y. (2010). Preservation technologies for fresh meat - A review. *Meat Science*, *86*(1), 119–128. https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2010.04.033